

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía patológica



TESIS DOCTORAL

**Resultados obtenidos por la acción de agentes físicos en la
ultraestructura de la glándula pineal de la rata blanca (Cepa
Wistar)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Aurora Guerra Tapia

DIRECTOR:

Alfredo Carrato Ibañez

Madrid, 2015

Aurora Guerra Tapia

TF
1981
106



* 5 3 0 9 8 5 5 9 3 X *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x - 52 - 117 661 - 3

RESULTADOS OBTENIDOS POR LA ACCION DE AGENTES FISICOS
EN LA ULTRAESTRUCTURA DE LA GLANDULA PINEAL DE LA RATA
BLANCA (CEPA WISTAR)

Departamento de Anatomía Patológica
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
1981



BIBLIOTECA

© Aurora Guerra Tapia
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-13980-1981

"RESULTADOS OBTÉNIDOS POR LA ACCIÓN DE AGENTES FÍSICOS
EN LA ULTRAESTRUCTURA DE LA GLANDULA PINEAL DE LA RATA
BLANCA (CEPA WISTAR)".

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID


AURORA GUERRA TAPIA.

D. ALFREDO CARRATO IBAÑEZ, CATEDRATICO DE LA UNIVERSIDAD -
COMPLUTENSE DE MADRID Y DIRECTOR DEL INSTITUTO CAJAL DEL
C.S.I.C.

CERTIFICO: Que el presente trabajo titulado: "RESULTADOS
OBTENIDOS POR LA ACCION DE AGENTES FISICOS EN
LA ULTRAESTRUCTURA DE LA GLANDULA PINEAL DE -
LA RATA BLANCA", ha sido realizado bajo mi di-
rección en el Instituto Santiago Ramón y Cajal,
por la Srta. Aurora Guerra Tapia, y constituye
su Tesis para optar al grado de Doctor en Medi-
cina y Cirugía.

Y para que conste a los efectos legales, expi-
do el presente certificado.

Madrid, 1 de Mayo de 1979



En cumplimiento de lo dispuesto en la legislación Académica vigente, tengo el honor de someter al criterio del Ilmo. Tribunal, la presente Tesis Doctoral para optar al grado - de Doctor en Medicina y Cirugía.

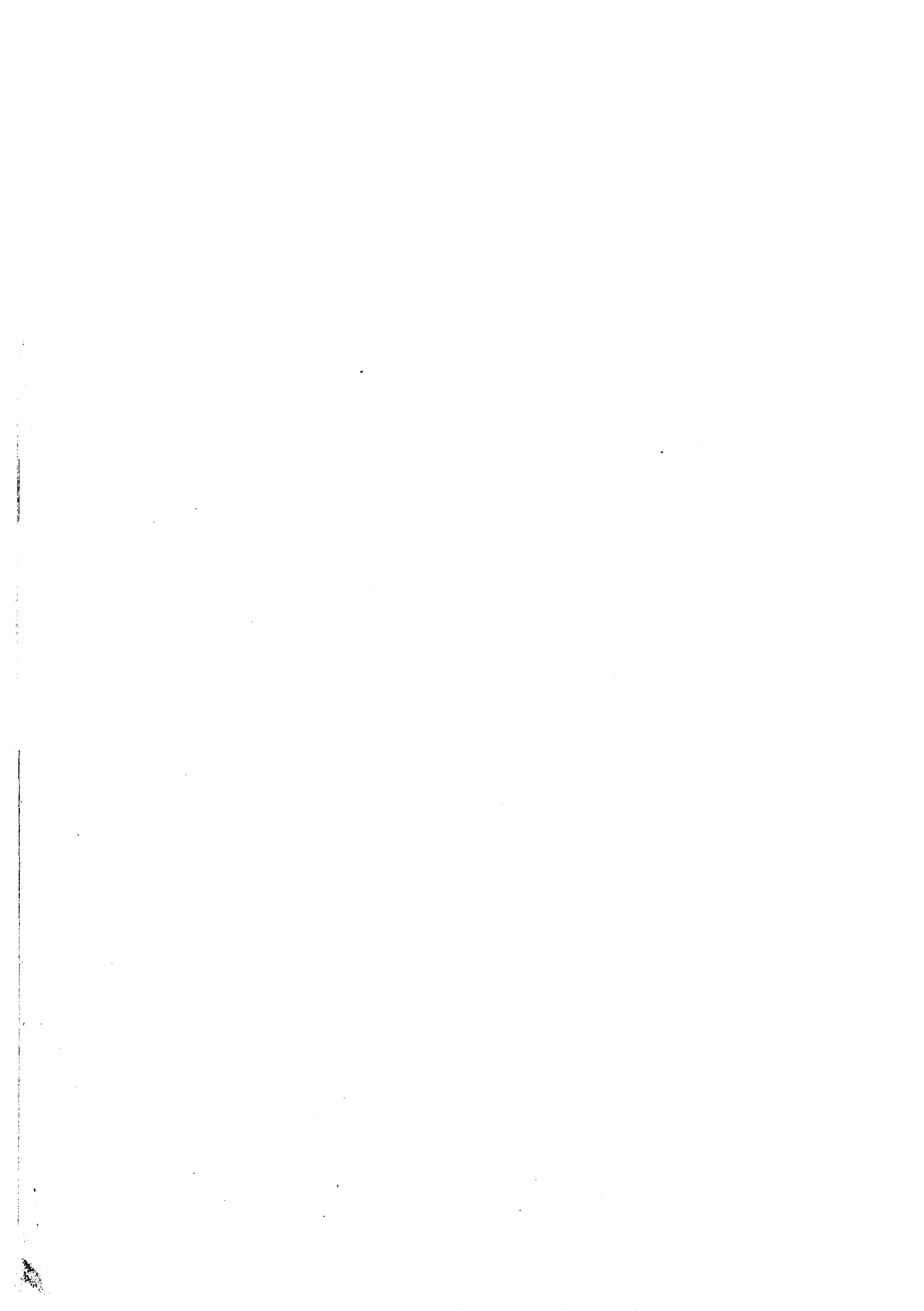
Mi trabajo ha sido realizado en la Sección de Citología e Histología comparada del Instituto Cajal del C.S.I.C., que dirige el profesor D. Alfredo Carrato Ibáñez, a quien agradezco muy sinceramente cuantas sugerencias y facilidades - en el desarrollo de esta Tesis han hecho posible su culminación en este modesto cuerpo de doctrina sobre un tema de indudable interés científico.

Así mismo, mi agradecimiento especial al Dr. D. Gabino González González, que como amigo y guía me ha brindado su valiosa ayuda en los estudios llevados a cabo con las técnicas electrónicas.

Quiero expresar mi gratitud a D. Eloy Blanco del Servicio de Microscopía Electrónica del C.I.B. que colaboró de una manera y otra en la realización de esta Tesis y a Purificación Arribas García, Técnica en Ultramicrotomía.

INDICE

	<u>PAG.</u>
INTRODUCCIÓN	1
MATERIAL Y METODOS	42
RESULTADOS	70
DISCUSIÓN	86
CONCLUSIONES	94
BIBLIOGRAFIA	99



INTRODUCCIÓN

Las investigaciones realizadas en estos últimos años sobre la significación de la glándula pineal en los mamíferos establece la hipótesis de que se trata de un órgano neuroendocrino (WURTMAN y cols 1968) que convierte el estímulo nervioso en una respuesta endocrina (la melatonina). Esta biosíntesis de la melatonina se realiza a través de una enzima, denominada hidroxí-indol-0-metiltransferasa (HIOMT), (AXELROD y WEISSBACH, 1961). Esta enzima está presente en el citoplasma del pineocito, y se ha establecido que un aumento de la actividad de la HIOMT es seguido de un aumento de la función secretora de la glándula pineal y viceversa (WURTMAN y cols, 1968).

El estímulo de la glándula pineal proviene de la acción de la noradrenalina procedente de las fibras postgangliónicas del ganglio simpático cervical superior (AXELROD, SHEIN y WURTMAN, 1969). Está demostrado que estas fibras constituyen el eslabón final de múltiples vías que comienzan en la estimulación de los conos y bastones retinianos por la luz ambiental (MOORE y cols, 1968).

Las continuas investigaciones realizadas por morfólogos, bioquímicos y fisiólogos acerca de la constitución íntima de la glándula pineal, han evidenciado detalles importantes pero todavía queda un camino a recorrer para una solución

satisfactoria a los problemas hasta ahora planteados.

Entre los autores antiguos, existía tal desacuerdo en la forma de valorar la estructura de la glándula pineal, que seguramente no existen dos que posean igual criterio en la interpretación funcional de los diversos tipos celulares.

Los estudios histológicos sobre la morfología de la glándula pineal se inician con: KÖLLIKER (1850), FAIVRE (1857), CLARKE (1862), BIZZOZERO (1868). HENLE (1871). BIZZOZERO (1891) describe la glándula pineal humana y sistematiza dos tipos celulares uno de naturaleza nerviosa y un segundo tipo de naturaleza conectiva. MEYNERT (1871), HAGEMANN (1872) y HENLE (1887) tratan de hacer otra clasificación citológica basados en hipótesis de una naturaleza nerviosa fundamental de las mismas. Es CIONINI (1885) junto con EDINGER (1899) y WEIGERT (1895), quien establece el carácter neuróglíco de lagunas células epifisarias.

DIMITROVA (1901) realiza una monografía sobre la glándula pineal en mamíferos. Describe también el elemento neuroglial y las bolas o granos de secreción que llevan su nombre, de preferente localización intranuclear, comprobando por primera vez, la presencia de fibras musculares estriadas en la epífisis del buey (*Bos taurus* B).

CUTORE (1911) observó células de carácter epitelial con inclusiones en su citoplasma, que limitan cavidades tubulares o utriculares; elementos linfáticos que en los grandes mamíferos son numerosos y enmascaran los elementos epiteliales. Existe además un tejido conectivo que contribuye a la formación del cuerpo pineal, revistiendo su superficie e insinuándose en su espesor en forma de trabéculas. El conectivo contiene fibras elásticas, vasos sanguíneos, lagunas linfáticas, células pigmentarias redondas o ramificadas, perteneciendo, estas últimas, a la categoría de Mastzellen.

KRABBE (1911) propuso que por investigaciones anatómicas - se podría llegar a la conclusión de que la glándula pineal del hombre adulto y senil, es un órgano degenerado completamente o bien, tiene alguna función.

Es ACHUCARRO (1913), quien junto con SACRISTAN (1912) realiza la más importante aportación de la Escuela Española - de Histología en el estudio de la glándula pineal en los mamíferos y en especial en la raza humana describiendo los tabiques conectivos y la neuroglía existente en esta glándula.

ACHUCARRO y SACRISTAN (1912) aplicando los métodos de -
BIELSCHOWSKY, de ACHUCARRO y el nitrato de plata reducido

de CAJAL demuestran el contenido neurofibrillar de dichas células y por lo tanto el carácter neuronal y enseñan que sus apéndices divergentes acaban en mazas, a veces ramificadas digitiformemente, concurriendo todas las tumefacciones finales sobre las paredes vasculares.

Créanse, de este modo: vastos sistemas de empalizadas nerviosas pericapilares, de cuya disposición da idea el esquema hecho en un trabajo de ACHUCARRO en 1912.

Otro factor indudable del parénquima de la epífisis es la neuroglia, que ACHUCARRO ha impregnado bien tanto con su método, como con el sublimado-oro de CAJAL.

Entre los astrocitos parecen dominar los de tipo fibroso.

La trama conectiva vascular es abundante. Además de los capilares aparecen en este estroma, leucocitos, células pigmentarias redondas y ramificadas, fibras elásticas y sobre todo un denso retículo intersticial, coloreable por el método de ACHUCARRO. El sistema conectivo fundamental arranca de la piamadre del órgano y se extiende en su espesor guiado por los vasos y paquetes sanguíneos, Alrededor de los vasos, la túnica adventicia se encuentra, casi en la totalidad de los casos que se han examinado, manifiestamente separadas de lo restante de la pared del vaso, mar-

cándose así claramente el espacio linfático de VIRCHOW ROBIN, del mismo modo que sucede en los vasos del sistema nervioso central.

En la epífisis, que presenta muy marcados los fenómenos regresivos, se encuentran los vasos envueltos en los tabiques conectivos, formando paquetes y conglomerados vasculares.

ACHUCARRO y SACRISTAN, estudiando este tejido conectivo intralobulillar en la piel humana, dicen que han establecido cuatro tipos de organización:

- 1º Trabéculas penetrantes no reticuladas.
- 2º Tejido reticulado de trabéculas finas.
- 3º Red de trabéculas gruesas y de organización más compleja.
- 4º Fibras ensortijadas.

Todo el material utilizado por ACHUCARRO y SACRISTAN ha sido en epífisis de hombre adulto, además examinaron epífi sis de toro y de carnero. Los métodos de coloración empleados han sido, azul de Toluidina, Hematoxilina-Eosina, Van Giessom, Alzheimer con la Hematoxilina de Mallory, Heidenhain, Weigert, Bielschowsky y Cajal, especialmente el método de tanino y la plata amoniacal ideado por ACHUCARRO.

Antes de pasar a la descripción de las estructuras constituyentes del lobulillo pineal, nos quedan por mencionar algunos elementos celulares encontrados en los espacios perivasculares por ACHUCARRO y SACRISTAN. Son éstas las células cebadas o Mastzellen de EHRLICH; las células cianófilas o plasmazellen y las células granulograsientas o Kornchenzellen, encontradas únicamente en el hombre por estos mismos investigadores.

En varios de los últimos trabajos sobre la estructura de la glándula pineal se consigna la existencia de ciertas células con granos basiófilos en su protoplasma y que algunos autores sólo dudosamente y otros con seguridad, identificaron con las células cebadas o Mastzellen. Son las mismas células vistas en las preparaciones hechas por ACHUCARRO y SACRISTAN en el hombre y en el toro.

Considerando ahora los elementos esenciales del órgano, es decir, las células y fibras contenidas en el espesor de los lobulillos, ACHUCARRO y SACRISTAN en 1912, examinando la pineal de toro teñida por el Azul de Toluidina, ven que el lobulillo se encuentra, casi en su totalidad, compuesto de unas células de tamaño como de unas veinte micras, con protoplasma abundante y uniforme, teñido de rosa por el reactivo, en el cual a veces se encuentran inclusiones pigmentarias de color moreno, como de melanina. Dichas células

las tienen un núcleo vesiculoso con nucleolo bien determinado, rodeado de algunos corpúsculos cromáticos, con una tenue red de linina y que en su totalidad, casi siempre, - se parece a un núcleo nervioso más que a un núcleo de neuroglía.

En el carnero y utilizando el mismo método de teñido, las células de los lobulillos no aparecen ni tan grandes, ni - tan bien limitadas en los contornos de su protoplasma. En las buenas preparaciones de Azul de Toluidina, el protoplasma de las células aparecen como formando una red sincitial de mallas estrechas, en cuyos nudos se encuentran los núcleos.

En el hombre las cosas toman diversos aspectos, de unos a otros casos encontramos diferencias considerables en la riqueza celular de lobulillos y en la mayor o menos retracción de los protoplasmas de los núcleos.

Las importantísimas investigaciones de ACHUCARRO y de los hermanos SACRISTAN (1912), sobre la textura íntima de la - epífisis, inauguraron una nueva era en su conocimiento, haciéndolo avanzar considerablemente, ya que sus observaciones fueron confirmadas seguidamente por BIONDI (1912), - KRABBE (1911) y otros, quienes en sus monografías no aportan dato citológico alguno de interés que no fuera ya señalado por los neurólogos españoles. Estos, sin embargo, -

aún supliendo con sagacidad e intuición la insuficiencia - de la técnica de su estudio, no pudieron dar el esquema - fundamental del órgano epifisario; aunque reconocieran y describieran con la mayor exactitud, los caracteres de sus componentes celulares.

ACHUCARRO y SACRISTAN (1912) revelaron en el cuerpo pineal con ayuda de los métodos de Cajal y Bielschowsky, dos clases de células, unas pequeñas con tres o cuatro prolongaciones fibrilares, algunas terminadas en maza cerca de los vasos y otras algo mayores y con prolongaciones más complicadas, situadas éstas muy cerca de la pared conectiva del lobulillo, enviando a los vasos una o varias prolongaciones, que después de atravesar la pared conjuntiva, se dividen en ramificaciones finas, terminadas en mazas.

Estas células; sin embargo, sólo existían en pineales con fenómenos involutivos muy acentuados. Teniendo en cuenta su forma y su estructura netamente fibrilar, semejante a la de las células nerviosas, ACHUCARRO y SACRISTAN las denominaron como corpúsculos ganglionares de tipo simpático.

Uno de los elementos más discutidos y que han adquirido mayor importancia, es el pineocito de los mamíferos o célula pineal, lo constituyen las prolongaciones y mazas terminales de los mismos; con las denominaciones de clavas o ma-

zas terminales fueron descritas por DEL RIO-HORTEGA (1923) y ACHUCARRO y SACRISTAN (1912), por otra parte, el primero insiste en la gran abundancia de estas clavas en torno a los espacios perivasculares.

El pineocito o célula epifisaria fue descrito primeramente por DEL RIO-ORTEGA en 1923, casi todos los autores están de acuerdo en aceptar que la descripción dada por el español no ha podido ser superada. Los pineocitos son células grandes, de núcleo valuminoso y con prolongaciones citoplásmicas, que terminan en "bulbo" en los espacios perivasculares y perilobulares. Estas células se encuentran rodeadas de tejido conectivo y suelen estar bastante separadas las unas de las otras.

Estas células no pueden ser consideradas ni como neuronas ni como neuroglía. El material y técnica empleada por DEL RIO-HORTEGA, era el siguiente: la aplicación al estudio de la epífisis de los modernos métodos de la impregnación argentina de la escuela de Cajal, de tan provechosos resultados, que sin duda alguna en ellas está la clave para el descubrimiento de las estructuras que hasta ahora se han mostrado refractarias a la coloración.

El método áurico de Cajal, sin reproche para la coloración de la glía intersticial de los lobulillos, no sirve para -

la tinción de las células parenquimatosas. En cuanto a -
los procedimientos citológicos generales y los gliofibrila
res usados por DIMITROWA, VERNE, WEIGERT, etc., tampoco -
son de elección habiendo métodos argénticos que puedan su-
perarlos.

El estudio de las dos especies de corpúsculos existentes -
en los lobulillos pineales requieren el empleo, por lo me-
nos, de dos técnicas electivas; una para la impregnación -
de las células propias del parénquima y otra para la demos-
tración de la neuroglía intersticial.

"Nuestro método del carbonato de plata -dice RIO-HORTEGA-
algo modificado, a veces, y el proceder de oro sublimado -
de Cajal son los que hoy reúnen mejores condiciones para -
el descubrimiento de los caracteres morfológicos de ambas
especies celulares. En cuanto a su estructura, hemos ha-
llado recursos suficientes para observarla con el método -
del carbonato argéntico".

Los resultados de los procedimientos citados son los si-
guientes: el método áurico de Cajal tiñe los corpúsculos -
neuróglícos que se hallan repartidos en la masa de los lobu-
lillos enviando apéndices protoplasmáticos en todas las di-
recciones. El carbonato de plata, cuya aplicación es sucep-
tible de variaciones para cada estructura, tiñe;

- 1º Las células neuróglícas y sobre todo las gliofibrillas que se entrelazan en el parénquima y las granulaciones metacromáticas que llenan a veces el protoplasma glial.
- 2º Las células parenquimatosas, con sus abundantes expansiones y sus mazas terminales.
- 3º El conectivo, en sus diversas formas ensortijadas, reticulares, fasciculares, etc...

El método de ACHUCARRO, por último, modificado convenientemente, es capaz de teñir las gliofibrillas, el conectivo y las estructuras granulares (mitocondrias, granulaciones diversas).

Las observaciones de RIO-HORTEGA en 50 pineales, pertenecientes a individuos de diferentes edades, desde la infancia hasta la senectud, muertos de enfermedades comunes y de procesos encefálicos (corea, parálisis general, tabes, demencia precoz, demencia senil, uremia, meningitis tuberculosa y meningocócica, etc.). La más joven pertenecía a un niño de ocho años y la más vieja a un centenario. Aunque los estudios de RIO-HORTEGA y su escuela se refieren casi exclusivamente a la pineal humana, han hecho exploraciones comparativas con algunos mamíferos.

RIO-HORTEGA resume los caracteres morfológicos de las células parenquimatosas y esquematiza su estructura y agrega - que no dice nada respecto a su probable significado funcional, aunque éste es un problema sumamente difícil de abordar.

Dice RIO-HORTEGA que sin vacilación puede afirmarse que dichas células no pertenecen a ninguno de los tipos conocidos de neuroglía, de los que se diferencian profundamente por su forma estructural y reacciones microquímicas, a pesar de que éstas difieren mucho de las diferentes variedades de gliocitos y es forzoso darle un valor muy relativo.

La mayor semejanza con la neuroglía está en las expansiones perivasculares y perilobulillares, que imitan mucho a los pies de inserción vascular (tan característicos de aquellas), que patológicamente se desinsertan y forman mazas - de idéntico aspecto, pero con diferente colorabilidad. Sin vacilar, puede afirmarse también que las células pineales no corresponden a ninguno de los tipos conocidos de células nerviosas, aunque recuerdan algo a ciertas neuronas simpáticas en estado regresivo y aunque las expansiones terminadas en clava se asemejen mucho a las mazas de retracción de las neuritas lesionadas.

Además RIO-HORTEGA dice que si hubiera alguna duda todavía, bastaría observar la verdadera neuroglía existente siempre

en la pineal o las células nerviosas heterotópicas y rarísimas que a veces se sorprenden, para ver cuanto difieren de los corpúsculos propios de la epífisis. Resulta, por consiguiente, que las células parenquimatosas tienen caracteres equidistantes de las nerviosas y de las neuróglícas, constituyendo una modalidad celular con aspectos típicos - que deben ser estudiados aparte.

Respecto a su probable función, no se pueden aventurar juicios. Hoy por hoy creemos que si durante el desarrollo - existen fenómenos secretores en las células parenquimatosas, duran escaso tiempo en la pineal humana, donde parecen conservarse solamente en ciertos corpúsculos poco diferenciados morfológicamente y en muchos rastos se parecen a la neuroglía. Según RIO-HORTEGA y colaboradores, la neuroglía existe en la glándula epifisaria en proporciones semejantes a las que se observan en el cerebro, distribuyéndose entre las células nobles del parénquima y ofreciendo los aspectos morfológicos y estructurales que la caracterizan, a los que se suman, en la pineal humana, una variedad caracterizada por sus abundantes granulaciones citoplásmicas.

Mas estos aspectos citológicos de la neuroglía no son tan comunes en la pineal humana como otros fácilmente revelables en el carbonato argéntico, y hasta hoy desconocidos, que existen en mayor o menor abundancia en los lobulillos

pineales, situándose principalmente en su periferia. Corresponden a células de forma y tamaño variadísimo, unas - veces poliédricas, otras alargadas, otras irregulares, angulosas y estrelladas, mostrando expansiones gruesas con - escasas dicotomías y ligera apariencia neuróglia.

Su característica esencial consiste, en que constantemente aparecen llenas de gránulos con todos los atributos de los granos de secreción.

Se trata, por lo general, de células con núcleo pálido, no muy diferente del que poseen los elementos parenquimatosos comunes, en cuyo protoplasma se amontonan granulaciones finísimas unas veces y otras muy voluminosas, con todos los estadios intermedios que con el carbonato argéntico exhiben variedad de matrices.

Al observar los caracteres morfológicos de estas células - se aprecia alguna relación con la neuroglia, mas en concepto de RIO-HORTEGA, se trata evidentemente, de una variedad de elementos parenquimatosos diferenciados en sentido secretor, o lo que parece más probable, con persistente carácter glándular. Hay pineales en las que la elaboración de granos de esta especie de células, alcanza desusadas - proporciones y hemos visto casos en que tal actividad secretora se relacionaba con la presencia de quistes llenos de un líquido seroso, que parecen debidos al estancamiento

del producto elaborado por células de referencia.

Sin entrar en más detalles que alargarían demasiado esta descripción, "se deja sentado - dice RIO-HORTEGA (1923)- que la pineal del hombre adulto (no sólo en la primera - infancia), existen evidentes fenómenos de secreción y -- que estos fenómenos no radican, según todos los indicios, en las células más nobles del órgano, sino en ciertos corpúsculos parenquimatosos morfológicamente poco diferen-- ciados.

RIO-HORTEGA, en una recopilación de estudios y conferencias en 1926, resume el esquema histológico del órgano - pineal que difiere mucho del de los autores que con mayor tesón se han ocupado de su estudio. En el hombre, se trta de un órgano constituido por una variedad de células con caracteres únicos que no pueden ser incluidas entre - las nerviosas, ni entre las neuróglícas y cuya significación es enigmática.

Entre estas células existen corpúsculos menos diferenciados morfológicamente, que muestran fenómenos de actividad secretora hasta en el hombre adulto y que parecen repre-- sentar a los elementos netamente glandulares que forman - en algunos mamíferos la porción mas importante de la pi-- neal. Como elementos intersticiales, existen en estos órganos células neuróglícas típicas, que abundan mas o menos

según las circunstancias y que constantemente representan la mas mínima parte del tejido epifisiario. Sólo como - excepción, se halla algún elemento nervioso verdadero y - no se sabe con exactitud de donde vienen las fibras nerviosas aferentes, ni que relación tienen con las células del parénquima. En suma, las investigaciones de una pléyade de histólogos y neurólogos, efectuadas a favor de - las mas modernas técnicas, no han podido conducir todavía a otro resultado que al discernimiento de los caracteres de forma y estructura de los elementos parenquimatosos y de los corpúsculos intersticiales y a la suposición, jamás debidamente comprobada, de que en la pineal existe - una actividad secretora.

RIO-HORTEGA dice que sus mas recientes estudios de 1923-26, prueban el carácter glandular del órgano pineal, pero hacen pensar que en éste existen una función secretora, en la que participan algunos elementos, y además una función superior adscrita a los elementos parenquimatosos mas diferenciados de la pineal humana. Todo esto es algo cierto y puede constituir una base para futuras investigaciones, mas a pesar de todo esfuerzo, se termina confesando que de la histología de la pineal conocemos - un poco solamente y que su fisiología puede representar un interrogante.

Se han señalado por distintos autores las conexiones existentes en la organización de la pineal en vertebrados inferiores y en los que predominan vías de inervación para sus distintos componentes celulares, algunos de los cuales están asociados a la comisura habenular y a los núcleos de la comisura posterior (órgano parietal y parapineal) y probablemente también con órgano sub-comisural (órgano frontal y epífisis), (EAKIN y STEBBINS 1959; KELLY, 1962, 1963; KUWANO, 1964; EAKIN 1964; OKSHE y VAUPEL VON HARNACK, 1965; ARIENS KAPPERS, 1965).

Las células ganglionares, que contribuyen a demostrar estas vías con los axones, se localizan en las paredes de los órganos pineales. Esto parece claro cuando examinamos órganos frontales y epífisis de la rana (HOLMGREN, 1918a, b; OKSCHE y VAUPEL VON HARNACK, 1965) y también en los aspectos degenerativos del nervio del ojo parietal del lagarto (EAKIN, 1964), aunque no sucede lo mismo en las epífisis de los renacuajos (KELLY, 1963).

Pueden existir también proyecciones hacia regiones hipotálamicas en algunas especies, (por ejemplo ALTNER, 1965, que estudia el tiburón), pero las rutas o vías exactas con las conexiones centrales y ramificaciones de algunos de estos componentes neurales, no han sido adecuadamente determinados. Sin embargo, en el momento actual los componentes neurales autónomos nunca han sido demostrados en

tre las vías conocidas que caracterizan al órgano sacular pineal de la mayoría de los vertebrados inferiores. Esto difiere sustancialmente en cuanto nos referimos a los mamíferos y probablemente a algunas aves, en donde existe, evidentemente, un componente simpático dentro del sistema pineal. LE GROS CLARK (1939-1940), sospecha que en los órganos pineales de los mamíferos, las fibras nerviosas procedentes de la región habenular y de la comisura posterior y que discurren a través de la epífisis, pueden entrar y salir de ella sin dejar terminaciones. De hecho ARIENS KAPPERS (1960-65) muestra en la rata albina que todas estas fibras pueden pasar a través de la glándula sin producir terminaciones y que la única y exclusiva inervación del órgano procede de las fibras simpáticas que entran en la pineal por el par del nervio que discurre por la tienda del cerebelo y van a terminar profundamente en el parénquima. La mayoría de los axones simpáticos tienen sus cuerpos celulares localizados en el ganglio simpático cervical superior, hecho ya demostrado por los estudios degenerativos subsiguientes a la gangliectomía del cervical superior (ver DE ROBERTIS, 1964; RODIN y TURNER, 1965; DUNCAN y MICHELETTI, 1966).

ARIENS KAPPERS, teniendo en cuenta los trabajos suyos y de otros investigadores, ha establecido que al menos en el gato y en la rata la gran mayoría de las fibras que inervan la pineal son simpáticas y las contribuciones para

simpáticas no son características en forma genérica de la pineal de los mamíferos. Este autor demuestra la existencia de fibras procedentes de los ganglios cervicales superiores que llegan a la pineal por vía extracerebral. Se trata de fibras amielínicas que acompañan a los vasos y penetran en el cráneo, atravesando al cerebelo llegan finalmente a la epífisis. J. ARIES KAPPERS; (1965), que ha abordado nuevamente el problema de la glándula epifisaria, confirma las ideas CAJAL (1909) en este sentido.

No hay evidencia que indique la existencia de fibras sensoriales que desde el órgano se dirijan hacia otras regiones cerebrales. Son interesantes los experimentos de KENNY (1961) el cual ha deducido con estudios degenerativos subsiguientes a la sección de los nervios petrosos mayores en el macaco, que fibras pregangliónicas parasimpáticas penetran en el órgano y establecen sinápsis con el -- cuerpo de las neuronas que se localizan con frecuencia en la pineal de los monos. Sin embargo, no es seguro que estos cuerpos celulares representen neuronas parasimpáticas postgangliónicas como KENNY ha dicho; o se trata de neuronas simpáticas distales.

En el macaco, en la oveja, el perro, el murciélago, el gato, la rata y el hombre, al parecer, existen otras fibras que llegan al órgano por el tallo de la pineal. Se trata probablemente de fibras comisurales aberrantes de la habé

nula o de la zona comisural posterior, que describen una espiral hacia adentro y hacia afuera del órgano y tienen una pequeña significación en la fisiología de la pineal- (revisar los trabajos de KAPPERS, 1965 y de KENNY, 1965).

El conocer las conexiones de la glándula epifisaria con el resto de las estructuras nerviosas, es sin duda el hecho que puede sentar, sin ningún género de dudas, su importancia funcional. La pineal, en efecto, mantiene relación con otras zonas del cerebro, de modo especial con la habénula y el órgano subcomisural. Fibras procedentes de estos órganos penetran en la pineal. No cabe duda de que existe una relación con las estructuras rinencefálicas, - si no directamente, si a través de la habénula o el hipotálamo.

Pertenece a RAMON Y CAJAL (1904) el mérito de haber demostrado, por primera vez, que la glándula pineal recibe fibras nerviosas simpáticas procedentes de las células ganglionares del ganglio cervieal superior del tronco simpático.

Más adelante, PINES (1925), estudió también la inervación de la glándula, que guarda una estrecha relación con el sistema ortosimpático. RODRIGUEZ PEREZ, DE LOS RIOS SAINZ DE LA MAZA (del Instituto Cajal), en 1963, insisten también en que la inervación de la pineal es exclusivamente-

procedente del ganglio cervical del simpático y que las fibras nerviosas son de carácter adrenérgico. Cada mitad de la glándula está inervada por el ganglio simpático homolateral.

Pero al lado de las opiniones de los autores que atribuyen a la epífisis una inervación exclusivamente simpática, está KENNY (1965), que habla de que las fibras parasimpáticas forman parte del gran nervio petroso superficial, bordeando la glándula por la superficie dorsal nervi-conarii, siendo preganglionares, y estableciendo una sinápsis, bien con células nerviosas que están contenidas en el espesor de aquellas o reunidas en un ganglio situado en el polo posterior de la pineal, que ha descrito PASTORI en 1928, con el nombre de ganglio conarii. Los axones de las neuronas de este ganglio, en número de veinte o treinta en el mono, profundizan en la glándula acompañando a los vasos.

Respecto a la terminación de las fibras nerviosas podemos decir que ya CAJAL en 1904 señaló que terminaban en botones, anillos y espátulas, en la vecindad de los pineocitos. RODRIGUEZ PEREZ, 1962 y ARIENS KAPPERS, 1960, describen los mismos tipos de terminaciones. Estas terminaciones adrenérgicas están caracterizadas por su contenido plurivesicular, (DE ROBERTIS y PELLEGRINO DE IRALDI y cols. 1961) el cual parece constituido por vesículas claras y vesículas granulares, midiendo ambas de 400 a 625 Å de --

diámetro. Una observación similar fué hecha por RODIN y TURNER (1965-1966). Por otra parte, tres tipos de vesículas han sido descritas en las terminaciones adrenérgicas de la pineal de la rata por BONDAREFF (1965), HALARIS y cols. (1967) y HASSLER y BAK (1966): Vesículas granulares y agranulares de aproximadamente 450 \AA de diámetro, así como grandes vesículas granulares es considerablemente menor que el correspondiente a las vesículas granulares y agranulares de menor diámetro. Los tres tipos de vesículas antes señalados, han sido también descritos por WARTENBERG (1968).

Investigaciones experimentales, incluyendo la gangliectomía cervical superior y la autorradiografía con marcaje de isótopos, han demostrado que las vesículas granulares de las terminaciones de las fibras nerviosas de la pineal, contienen aminas biogénicas, (COLLIN y KAPPERS, 1968). Muchos autores están de acuerdo en que esta amina biogénica es la noradrenalina; pero otros autores son de la opinión de que las vesículas granulares de mayor diámetro -- pueden contener también serotonina.

Los primeros estudios ultraestructurales sobre la glándula pineal se deben a MILOFSKY (1957), el cual describió el pineocito y las vesículas granulares contenidas en las fibras simpáticas. Más adelante se amplía la morfología submicroscópica del pineocito de la rata, con trabajos --

como los de GUSEK y SANTORO (1960), de MARTINO y cols. - (1964), ARSTILA y HOPPS (1964, GUSEK y cols. (1965), WOLFE (1965), RODIN y TURNER (1965), ARSTILA (1967); en el perro por SANO y MASHING (1966), en la vaca y en la oveja por ANDERSON (1965), en el gato por WARTENBERG (1965-1968), en el conejo por WARTENBERG y GUSEK (1965), LEONHART (1967), en el gato por DUNCAN y MICHELETTI (1966) y en el mono WARTENBERG (1968).

A grandes rasgos podemos resumir la estructura fina del pineocito. Contiene abundantes mitocondrias, retículo endoplásmico liso y rugoso en cantidades variables y un complejo de Golgi bastante desarrollado. En los mamíferos y en las aves los núcleos están invaginados y hay un número variable de gotas lipídicas en el citoplasma.

Las prolongaciones del pineocito son, a menudo difíciles de identificar en cortes finos (particularmente en roedores). Ahora bien, son más fáciles de distinguir de las prolongaciones gliales en los mamíferos superiores fijados con glutaraldehído, en los cuales aparecen unos microtúbulos de 200 a 250 Å de diámetro, en contraste con los filamentos más finos y condensados de las prolongaciones gliales.

Se han descrito por distintos autores diferentes organoides que podrían corresponder a material neuro-secretor.

Son masas, inclusiones laminares o vesículas granulares - de 300 a 500 \AA de diámetro que parecen ocupar las prolongaciones y las clavav terminales del pineocito, sobre todo en el mono y en la rata (WARTENBERG, 1968; WOLFE, 1965).

Estas inclusiones son semejantes a las identificadas en las terminaciones nerviosas de los órganos pineales de otras especies, vaca y gato, (ANDERSON, 1965; WARTENBERG, 1968). En el pineocito del gato tales inclusiones parecen estar ausentes (WARTENBERG, 1968; DUNCAN y MICHELETTI, 1966). No obstante admiten muchos autores que la morfología de estas inclusiones podría corresponder a la de los lisosomas. ANDERSON (1965) ha identificado típicas imágenes del lisosoma en el citoplasma de los pineocitos y de las células gliales.

Uno de los elementos más característicos de los pineocitos lo constituyen las prolongaciones y clavav terminales de los mismos, las cuales han sido descritas en torno a los espacios perivasculares por WOLFE (1965), PELLEGRINO y DE ROBERTIS (1961). Como hemos descrito anteriormente, algunas de estas clavav contienen formaciones lisosómicas y otras como en el caso de la rata, se caracterizan por la presencia de abundante condrioma, vesículas de retículo endoplásmico liso y vacuolas lipídicas (GUSEK Y SANTORO, -- 1960-1961), (GONZALEZ-G. cols., 1969).

La clava terminal del pineocito del gato, contiene mitocondrias y abundantes vesículas de tipo sináptico que verosímilmente podrían corresponder a formas vesiculares del retículo endoplásmico liso (WARTENBERG y GUSEK, 1965).

Los organoides más característicos de las prolongaciones y clavas terminales de los pineocitos son las barras sinápticas. Dichas barras aparecen como una doble estructura membranosa intensamente osmiófila y de un diámetro aproximado de 200 a 300 Å. Su longitud es variable y están rodeados de vesículas claras de tipo sináptico de 600 Å de diámetro, estas sinapsis se establecen entre las prolongaciones de los pineocitos o entre el pineocito y los botones adrenérgicos, (GONZALEZ - G. y cols. 1969). Bajo la denominación de "vesicle crowned rodlets" han sido descritas por WOLFE en 1965 en la epífisis de la rata, y son estructuras idénticas a las descritas con los nombres de "synaptic ribbons", "synaptic lamellae" o "synaptic rods" en las células fotorreceptoras de la retina DE ROBERTIS y FRANCHI, 1956; SJOSTRAND, 1958; y EVANS, 1966. Igualmente han sido descritas en la epífisis de la rata por ARSTILA y HOPUSU -- (1964), HOPUSU y ARSTILA (1965). Estas estructuras también se han localizado en las células neurosensoriales de la corteza del cobaya (SMITH y SKOSTRAND, 1961), en las células fotorreceptoras del órgano pineal de la rata (OKSCHE y VAUPEL VON HARNACK, 1963-1965); finalmente han sido descritas en la epífisis del gato (WARTENBERG, 1968) y en el órgano

pineal de la sardina (RUDEBERG, 1968). La morfología y textura de estas barras sinápticas es idéntica a la ya descrita por otros autores.

La presencia de células de glia (astroglia fibrillar) -- constituye, en la glándula pineal de muchas especies, el segundo elemento celular mayor en población, con características morfológicas bien diferenciadas en relación al resto de otros elementos celulares epifisarios (DUNCAN y MICHELETTI, 1966), (ANDERSON, 1965 y WARTENBERG, 1966-68). En la pineal de la rata no existen células de glía pero -- hay en cambio, otro elemento por WOLFE (1965) célula intersticial, nomenclatura poco apropiada a nuestro juicio ya que WOLFE las homologa así a las células intersticiales de CAJAL del intestino (1904). De acuerdo con los hallazgos realizados por GONZALEZ G. y ALVAREZ-URIA (1970), estos elementos no corresponden a las células intersticiales descritas por CAJAL al microscopio óptico y por TAXI (1965) al microscopio electrónico.

Como ya dijimos, en la parte correspondiente a microscopía óptica, la primera descripción de la innervación de la glándula pineal fue realizada por RAMON Y CAJAL en 1904 y confirmada en estudios ultraestructurales por KAPPERS -- (1960) y por WOLFE (1965). Muchas de las relaciones entre botones nerviosos y pineocitos parecen poseer las características morfológicas de una sinápsis (HOPPS y ARSTILA, -- 1965), (GONZALEZ G. y cols. 1969).

Otras terminaciones simpáticas se dirigen a los espacios perivasculares (PELLEGRINO y DE ROBERTIS, 1961), o terminan en sus capilares (MILOFSKY, 1957). La comprobación experimental de que esta inervación procede del ganglio simpático cervical superior, ha sido estudiada por KAPPERS (1965), RODRIGUEZ PEREZ (1962-1964), RODIN y TURNER (1965) y DUNCAN y MICHELETTI (1966).

Los engrosamientos o botones de estas fibras simpáticas contienen numerosas vesículas sinápticas de las terminaciones nerviosas simpáticas. Estos autores postulan que las vesículas granulosas son el sitio de almacenamiento de la noradrenalina, sustancia neurotransmisora simpática.

Así mismo, la serotonina o 5-hidroxitriptamina según los trabajos de BERTLER y cols. (1964) utilizando las técnicas histoquímicas de fluorescencia, se localiza en el pineocito y en las terminaciones nerviosas simpáticas. La serotonina en las fibras simpáticas, parece situarse en las vesículas granulares similares a aquellas de la noradrenalina, (SNYDER y cols. 1965).

Entre ellas, la más probada es la relacionada, se han atribuido a la pineal de los mamíferos numerosas funciones, que en su mayor parte se relacionan con el desarrollo y función de los órganos reproductores.

En los niños los tumores pineales que destruyen el tejido parenquimatoso, se asocian significativamente con una pubertad precoz. La extirpación quirúrgica de la pineal - de ratas produce un comienzo temprano de la pubertad y - del agrandamiento de los órganos reproductores. Por el - contrario, la inyección de extractos de pineal retarda la pubertad y reduce el peso del ovario. También se han pos-
tulado relaciones endocrinas entre la pineal con la adrenal y tiroides, pero ha sido difícil obtener evidencias - sobre esta relación.

Todavía el conocimiento sobre la fisiología y la bioquímica de la pineal es incompleto. Son notables varios hechos, la pineal tiene un rápido metabolismo del fósforo que se demuestra con el fósforo radioactivo.

La pineal contiene grandes cantidades de 5-hidroxitriptamina (serotonina), susceptible de localizarse tanto en -- las células parenquimatosas, como en las fibras autónomas. La mayoría de la serotonina presente, fuera del sistema nervioso central, no se localiza en las terminaciones nerviosas, sino en los mastocitos, células entero-cromafines, - plaquetas y pineocitos.

Esta amina se encuentra también localizada dentro de pocos núcleos y tractos en el cerebro y la médula espinal y se encuentra presente también en las terminaciones nerviosas de la glándula pineal. Las evidencias han demostrado

que la mayoría, sino toda la serotonina, en la pineal de la rata, es sintetizada dentro del pineocito; la mitad de este material está entonces almacenado en el lugar de la noradrenalina de las terminaciones simpáticas de la pineal.

Dos de los sustratos necesarios para la biosíntesis de la serotonina, proceden del triptófano, el cual ha sido identificado en la pineal, y probablemente se encuentren presentes en las células parenquimatosas, ya que pineales de ratas mantenidas en cultivos, pueden continuar la transformación de triptófano en serotonina, al menos por una semana.

LERNER aisló en 1958 la melatonina de la pineal de la rana y del buey, posteriormente WURTMAN y cols. en 1964, la han identificado en un pinealoma humano. La melatonina - ha sido descubierta en casi todas las especies estudiadas hasta el momento actual. Es un compuesto específico, la N-acetil-5-metoxitriptamina, que actúa como una poderosa hormona que contrae los melanocitos de la piel de los anfibios.

AXELROD y WEISSBACH en 1961 identificaron una enzima específica, la hidroxiindol-0-metil-trasferasa (HIOMT), que produce la melatonina por metilación de la N-acetil-serotonina. Esta enzima es exclusivamente de la pineal. En

la actualidad parece que el HIOMT es la enzima responsable de la producción de varios hidroxindoles que poseen actividades farmacológicas y posiblemente tengan significado fisiológico.

Pasamos a continuación a otro proceso fisiológico y bioquímico, a la vez que complejo y en evolución todavía, en el cual se ponen de manifiesto una serie de fenómenos en los que interviene la glándula pineal, el sistema nervioso simpático y el ritmo biológico de los animales.

Diversos estudios han sugerido con fuerza, que existe -- una relación entre la iluminación y la función de la pineal. Se han hecho experiencias en luz y oscuridad para aclarar el gran problema o enigma que encierra esta glándula, tan compleja y tan unida al sistema hipotálamo-hipofisario, que a través de un mecanismo FEEDBACK o de retroalimentación negativa puede suministrar algunos datos interesantes de significado funcional.

Desde hace tiempo se sabe que los ciclos reproductivos -- de los vertebrados están básicamente controlados por el dispositivo endocrino, pero también es harto conocido que las manifestaciones reproductivas de gran número de vertebrados aparecen con una periodicidad estacional.

En el año 1925, el z6ologo canadiense W. ROWAN, estableci6 la relaci6n existente entre la luz y el ciclo gonodal del junco apizarrado (*junco hyemalis*); esta ave desarrolla su ciclo gonodal activo durante la primavera, empezando a decrecer 6sta a finales de oto6o 6 a comienzos del invierno. El citado autor comprob6 que si al animal se le sometia a una iluminaci6n artificial creciente que compensase el ac6rtamiento de luz durante el oto6o, el junco manifestaba su recrudescimiento gonadal a mediados del invierno.

Por otro lado, en las ya cl6sicas experiencias de MARCHALL (1937), se habla de animales reproductores en "días cortos" y en "días largos", haciendo este término relaci6n a la duraci6n lumínica del día. Ejemplo típico de los reproductores en días cortos son los 6vidos, siendo los 6quidos el arquetipo de reproductores en días largos.

En el hemisferio boreal la oveja tiene su 6poca de mayor concepci6n entre los meses de septiembre y noviembre, pero si estos animales son trasladados al hemisferio austral en su mayoria puede observarse una inversi6n en la estaci6n reproductiva, verific6ndose entonces la concepci6n entre los meses de marzo y abril, que corresponden a los meses oto6ales del hemisferio boreal.

Los ejemplos mencionados hablan a favor de que el acorta-

miento de la iluminación durante las estaciones pone en marcha a los sistemas endocrinos vinculados a la reproducción, marcha que es desencadenada por un mecanismo nervioso. En la actualidad se admite que la luz actúa sobre las gónadas a través de transductores neuroendocrinos tales como la eminencia media del hipotálamo, la médula adrenal y la glándula pineal.

Los efectos que produce la luz sobre la glándula pineal, fueron observados por FISKE y cols. en 1960, y fué este uno de los primeros investigadores en demostrar que la estructura y la función de la glándula pineal variaba con relación al tiempo de iluminación u oscuridad. Sometidas ratas hembras y machos a una iluminación continua se comprobó que al cabo de este periodo el peso de la pineal de los animales sometidos a oscuridad no presentaban una notable variación. Estas experiencias han sido comprobadas por la escuela de WURTMAN y cols. (1968), en diferentes ocasiones, los cuales han comprobado que con tiempos relativamente cortos de iluminación continua se produce aumento de peso ovárico y testicular.

MILCOU en 1964, ha observado el efecto de la luz sobre el peso de la pineal en otras especies distintas de las ratas, tales como el pato, el ganso y el hamster.

El estudio de los cambios histológicos bajo la ilumina--

ción permanente ha sido hecho por ROHT y colaboradores en 1962, observando modificaciones específicas, como disminución de los nucleolos, basofilia y aumento de los gránulos citoplasmáticos, lo que sugiere a dicho investigador un aumento en el proceso de síntesis de las proteínas.

Los estudios de ROWAN antes mencionados demostraron el efecto de la luz sobre la actividad gonadal. Las experiencias en este sentido han sido realizadas en animales, tanto monoestrales como poliestrales. FISKE y cols.(1960) - hizo la observación de que algunos animales poliestrales como la rata, cuando se les somete a un régimen de iluminación constante, desarrollan cuadros de pubertad precoz. Junto al aumento de peso gonadal, no es raro encontrar hipertrofias uterinas y un aumento del flujo vaginal. En la hipófisis se encuentran grandes cantidades de LH en estas circunstancias experimentales, pero si el periodo de iluminación es demasiado largo, puede observarse el efecto contrario, apareciendo entonces atrofia uterina y descenso de LH hipofisaria, (MARIC DK., MATSUYAMA E. y LLOYD CW., 1965).

La relación de la pineal con la luz en la esfera de la reproducción fue puesta de manifiesto por JOCHLE (1956), al demostrar que los efectos de la luz en régimen continuo - eran modificados por la administración de extractos pineales. Este hecho, unido a la disminución del peso epifisaria

rio como consecuencia de la iluminación, sugiere una vía explicativa del mecanismo de acción por medio del cual actúa la luz en la pineal.

Resumiendo todas estas experiencias se puede decir:

Las pineales de ratas mantenidas con luz constante pesan menos y contienen células más pequeñas con menos basofilia citoplásmica y menor cantidad de lípidos que los animales que se mantuvieron a oscuridad constante o que han estado bajo fotoperíodos diarios normales. Con luz constante, la actividad de la HIOMT también se halla reducida:

Además durante la oscuridad, la captación de P^{32} por las pineales de rata es más alta y la cantidad de serotonina es menor durante el día. Los resultados de la ablación quirúrgica indican que esta respuesta tan acentuada, se encuentra mediada por nervios autónomos, que se han originado en los ganglios cervicales superiores.

Hay diversas evidencias de que las ratas tienen una función epifisaria variable según el ciclo sexual.

Mediante técnicas histoquímicas ZWEENS (1963) ha demostrado que el contenido en fosfolípidos de la pineal es mayor durante el diestro y menor durante el estro. Existen -- fluctuaciones similares en el contenido de serotonina y

y en la actividad de HIOMT de las pineales durante el ciclo sexual.

Finalmente se dice que las inyecciones de melatonina y de otros metoxiíndoles, que hoy se sabe que se encuentran en la pineal, reducen el peso ovárico y alteran las etapas del estro.

A la luz de estos conocimientos cabe pensar que la energía luminosa debe poner en marcha alguna sustancia inhibidora procedente de la pineal y que actúa sobre las gónadas directamente, o lo que es más posible, de forma indirecta a través del sistema de hipotálamo-hipofisario.

La naturaleza de este factor inhibidor es todavía una incógnita.

La luz, como ya se sabe por WEISSBACH y cols. (1960), activa la O-metilación de N-acetil-serotonina, proceso catalizado por la HIOMT, enzima muy abundante en la región pineal de los vertebrados superiores. Esta O-metilación lleva a la formación de melatonina. La luz actúa inhibiendo la actividad enzimática de la HIOMT, por lo que -- queda extraordinariamente reducida la formación de melatonina.

El aspecto más interesante, desde el punto de vista fisio

lógico, es el saber cuales son las rutas por las que la luz alcanza a la glándula pineal. El estímulo luminoso llegaría a la pineal a través de la retina por medio del sistema simpático, (MOORE y cols. 1968). Otros autores (HENDRICKSON y cols. 1972) opinan que la luz, actuando sobre otros transductores neuroendocrinos, especialmente -- los hipotalámicos, actuaría sobre la glándula pineal y ésta sobre la hipófisis. La segunda hipótesis parece ser la que más adeptos tiene debido a un bagaje experimental más amplio.

Antes de los trabajos de ARIENS KAPPERS (1960) y de la demostración de terminaciones simpáticas en el tejido pineal por la escuela de DE ROBERTIS (1964), ya CAJAL en 1904 según hemos anotado anteriormente, describió en el conejo -- células nerviosas intersticiales y fibras amielínicas que forman un rico plexo nervioso, con terminaciones libres en las células del parénquima, las cuales parecen emanar del simpático pericarotídeo.

Las teorías actuales sostienen la función neuroendocrina para la pineal de los mamíferos, por medio del empleo de metoxiíndoles específicos que actuarían como mediadores -- similares a hormonas que ayudan a regular la actividad -- rítmica del sistema endocrino gonadal.

A pesar de que en la actualidad hay numerosas evidencias

que sugieren esta participación, no se ha obtenido hasta ahora una prueba definitiva para tal hipótesis y la teoría de la actividad hormonoide de los metoxiíndoles requiere investigación en el futuro.

Como resumen de los aspectos morfofisiológicos más importantes de la glándula pineal en mamíferos, hemos de establecer los siguientes hechos:

El estímulo luminoso captado por la retina incide sobre la pineal a través de inervación adrenérgica; produce una inhibición en la síntesis de la HIOMT, enzima formadora de la melatonina, todo lo cual se traduce por una mayor actividad gonadal de los mamíferos.

MOORE y cols. (1968) trata de demostrar experimentalmente cómo el estímulo luminoso, a partir de la retina, se propaga en parte por el tracto óptico accesorio de la cintilla óptica, terminando en el núcleo de Bochenek (núcleo terminal medial de este tracto), las relaciones entre este núcleo y el centro simpático medular no están claramente establecidas.

Es a partir de los núcleos de origen, situados en el asta intermedio-lateral de la médula espinal, de donde parten las fibras pregangliónicas simpáticas hacia el ganglio simpático cervical superior; y es en éste donde se inician

las fibras postgangliónicas que abordan directamente a la pineal con sus engrosamientos o botones de paso que contienen dos tipos de vesículas; vesículas adrenérgicas, con un contenido osmiófilo en su interior y de unos 600 Å de diámetro y vesícula de mayor tamaño de unos 800 a 1.200 Å de diámetro y de probable contenido serotoninico.

Datos recientes han establecido por otra parte que cuando un animal es sometido al ritmo diurno y nocturno varias horas después de permanecer en la oscuridad, las concentraciones bajas de serotonina rápidamente recobran los valores normales en el día (ILLNEROVA, H. 1971), las concentraciones altas de la actividad de la N.acetiltransferasa baja de nivel en el día (KLEIN; D.C. and WELLER J.L. 1972) y la cantidad de melatonina en la glándula pineal y en la circulación sanguínea disminuye rápidamente (ROLLAG; M.D. and NISWENDER, G.D. 1976 y WILKINSON, M. y cols. 1977). Estos efectos intensos de la luz parecen estar controlado por un tracto neural de proyección retino-hipotalámica recientemente descrito por (HENDRICKSON y cols. 1972; -- MOORE, R.Y. 1973 y MOORE, R. and LENN, N.J. 1972). Esta importante vía neural es un tracto amielínico del nervio óptico que se origina probablemente en la capa ganglionar de la retina y se dirige al núcleo supraquiasmático, se trata de una vía diferente a la señalada por MOORE y cols. en 1968.

La ruta neural por la cual los estímulos nerviosos alcanzan la glándula pineal desde el núcleo supraquiasmático, se originan en dicho núcleo con proyecciones eferentes en dirección caudal hacia las áreas periventriculares y tuberales anteriores del hipotálamo (SWANSON, L. and COWAN W. M. 1975 y SZENTAGOTHAÏ, J. y cols. 1960) y de estas regiones partirían unas conexiones neurales a las porciones laterales del hipotálamo (SZENTAGOTHAÏ, J. 1960) y de aquí se originarían nuevas vías eferentes, que a través de la formación reticular del cerebro medio alcanzarían al asta intermedio lateral de la médula espinal cervical (SAPER, C.B. y cols. 1976), que constituye el núcleo de origen de las fibras preganglionares simpáticas que se dirigen al ganglio simpático cervical superior.

Las motivaciones razonadas para la realización de la presente tesis se basan en que la glándula pineal de la rata es el prototipo de un sistema de control neuroendocrino, cuya morfo-fisiología parece estar organizada primariamente alrededor de una actividad en la que, un impulso neuronal simple regula la producción y liberación de una sola hormona, a partir de una población celular homogénea. Hemos seleccionado la rata para nuestros experimentos, ya que es el animal que presenta menores costes económicos en su mantenimiento y de la que poseemos mayores datos -- bioquímicos e histofisiológicos; hemos omitido la utilización de glándula pineal de ratas hembras, ya que el ritmo

estral en estos animales hubiese hecho más complejas nue
tras investigaciones y también hemos optado por la no uti
lización de ratas adultas machos por ser la epífisis de -
éstas menos sensible a los agentes farmacológicos, físi--
cos y bioquímicos (WURTMAN y cols. 1965) en cambio la --
elección de la glándula pineal de las ratas prepúberes de
50 a 60 gr. de peso, con edades comprendidas entre 11/2 y
dos meses que son las que presentan mayor grado de sensi-
bilidad a estos cambios experimentales (EVERITT y HUAN G.
1965); finalmente señalemos que estos animales han comple-
tado al mes de nacimiento el desarrollo del complejo cir-
cuito neuronal existente entre el núcleo supraquiasmático
y la glándula pineal (YUWILER y cols. 1977); lo mismo ocu-
rre con los ritmos de la HIOMT (KLEIN, 1969), de la N-ace-
tiltransferasa (ILLNEROV y SKOPON 1976) y de la melatoni-
na (KLEIN, 1978), cuyas actividades empiezan a ser detec-
tables entre el primero y el segundo mes de vida de la ra
ta.

La elección de los agentes físicos, están en razón de dis
ponibilidad, como puede ser la inmovilización, el frío, -
movimientos de marcha forzada, etc. Para evitar una dis
persión en nuestras investigaciones hemos tratado de selec-
cionar una serie de agentes físicos, de gran importancia
en los fenómenos ecológicos como podrían ser, el calor, -
el frío y el esfuerzo físico (en forma de movimientos na-
tatorios). Por razones de sencillez metódica elegimos la

ultrasonificación. El calor se ha desechado ya que los problemas de obtener un habitáculo acondicionado para el mismo eran muy complejos y presentaban inconvenientes (deshidratación, falta de una buena ventilación y alteraciones locomotoras de estos animales entre otros). Con el frío el problema se solventó rápidamente con una vieja nevera de gran cubillaje, en los que se introdujeron las jaulas - con los animales y permitía a través de unas mangueras un perfecto sistema de ventilación. Finalmente sustituimos los movimientos natatorios por los de marcha forzada, -- obligando al animal a realizar un esfuerzo físico haciéndole desplazar continuamente por marcha continuada en el interior de un aparato cilíndrico; el principal problema - por el que hicimos esta sustitución de los fenómenos natatorios por los de marcha forzada es que durante la realización de los experimentos crónicos (quince días), la mayoría de los animales fallecían, al producirse una neumonía por aspiración.

La combinación o no de la gangliectomía bilateral del simpático cervical superior con los métodos físicos reseñados anteriormente está en razón de que le produzca ó no, una mayor facilitación o inhibición de la sensibilidad de la glándula pineal, que se pueden traducir en modificaciones de la ~~ultra~~estructura del pineocito.

MATERIAL Y METODOS

Hemos utilizado para nuestros experimentos ratas albinas de la cepa Wistar: 56 machos prepúberes de dos meses de edad, con un peso entre 50 y 60 gramos; divididos en catorce grupos de cuatro animales, según lo detallaremos más adelante.

Estos animales fueron mantenidos todos ellos antes del experimento en las mismas condiciones ambientales y de alimentación, desde ocho días antes de la iniciación del experimento, separadas en sus respectivas jaulas y a una temperatura ambiente de 25° C.

Distribución de los grupos

- 1.- Grupo control normal, animal intacto.
- 2.- Grupo de animales gangliectomizados, sacrificados a partir del día quince.
- 3.- Grupo de ratas sometidas a la acción de marchas forzadas, en experimento agudo, en sesión única, sacrificadas inmediatamente después del experimento.
- 4.- Grupo de ratas sometidas a ultrasonificación aguda, en aplicación única, sacrificadas inmediatamente después de actuar el agente físico.
- 5.- Grupo de ratas sometidas a la acción del frío en aplicación única, sacrificadas inmediatamente después del

experimento.

- 6.- Grupo de ratas sometidas a la acción de marchas forzadas, en experimento crónico, en sesión única y diaria, sacrificadas a los quince días del tratamiento diario.
- 7.- Grupo de ratas sometidas a ultrasonificación crónica, - en aplicación única diaria, sacrificadas a los quince días del tratamiento diario.
- 8.- Grupo de ratas sometidas a la acción del frío en aplicación única y diaria, sacrificadas a los quince días del tratamiento diario.
- 9.- Grupo de ratas con gangliectomía bilateral del simpático cervical superior y sometidas a la acción de marcha forzada aguda, en sesión única (a partir del día 15 del postoperatorio), sacrificadas inmediatamente - después del experimento.
- 10.- Grupo de ratas con gangliectomía bilateral del simpático cervical superior sometidas a ultrasonificación -- aguda, en aplicación única (a partir del día quince - del postoperatorio) sacrificadas inmediatamente des--pués del experimento.
- 11.- Grupo de ratas con gangliectomía bilateral del simpá-

tico cervical superior, sometidas a la acción del frío, en aplicación única (a partir del día quince del postoperatorio) sacrificadas inmediatamente después del experimento.

12.- Grupo de ratas con gangliectomía bilateral del simpático cervical superior y sometidas a la acción de marcha forzada, en experimento crónico, en sesión única y diaria (a partir del día quince del postoperatorio) sacrificadas a los quince días del tratamiento diario.

13.- Grupo de ratas con gangliectomía bilateral del simpático cervical superior, sometidas a ultrasonificación crónica, en aplicación única diarias (a partir del día quince del postoperatorio) sacrificadas a los quince días del tratamiento diario.

14.- Grupos de ratas con gangliectomía bilateral del simpático cervical superior, sometidas a la acción del frío, en aplicación única y diaria (a partir del día quince del postoperatorio) sacrificadas a los quince días del tratamiento diario.

Para la realización de las marchas forzadas hemos utilizado un aparato cilíndrico giratorio de 50 cm. de diámetro

de fabricación propia y manejo manual de tal modo que al girar el cilindro el animal marcha espontáneamente en sentido contrario al giro y con la velocidad de este; hemos imprimido giros de 24 a 30 r.p.m., durante 60 minutos en los tratamientos agudos y de una duración de 30 minutos en los tratamientos crónicos. Para el tratamiento ultrasónico hemos utilizado un modelo S-125 Brawson ultrasóni-co-Brawson Instruments, Danbury, Conn; U.S.A.; durante - 40 minutos en los tratamientos agudos y de una duración de 20 minutos en los tratamiento crónicos.

Para el tratamiento con el frío, hemos utilizado un habitáculo acondicionado a 4² C; durante 24 horas, empezando a las nueve de la mañana en los tratamientos agudos y de una duración de 11 horas (de 11 p.m. a 10 a.m.) en los - tratamientos crónicos.

Técnica quirúrgica empleada.

La gangliectomía del bilateral del simpático cervical superior fué según el protocolo que a continuación se detalla:

1².- Anestesia del animal mediante una solución de hidrato de cloral al 35% en agua destilada, inyectando por vía intraperitoneal 0,1 c.c. por cada 100 gramos de peso del animal.

2º.- Seguidamente se efectuó el afeitado y desinfectado de la cara anterior del cuello del animal.

3º.- Incisión media del cuello de dos centímetros para - efectuar la visualización, disección roma del tronco simpático de cada lado, para separarlo del paquete vasculo-nervioso y extirpación del ganglio simpático cervical superior de ambos lados.

4º.- Sutura de los planos profundos con seda (000).

5º.- Se sutura la piel y demás capas con seda de (000) y aguja atraumática, seguidamente desinfección de la herida operatoria con yodo.

Una vez terminada la intervención, la rata es puesta en una jaula sobre acolchamiento de algodón y separada para evitar el desgarro de la herida, en jaula individual; se la mantiene en ayunas antes y después de la intervención y al cabo de dos horas se le suministra agua, para después, seguidamente, una vez recuperadas, continúan en las mismas condiciones ambientales y de alimentación reseñadas anteriormente.

Los animales fueron decapitados, para luego abrir el - cráneo con una gubia, despegar las meninges y depositar sobre la pineal que está superficialmente, una gota de -

fijador OSMIO PALADE Ph 7,2 luego extraer la glándula pi
neal, seccionándola por su tallo, que está entre los dos
lóbulos cerebrales y el cerebelo; se colocó sobre una lá
mina de parafina con unas gotas del mismo fijador y se -
seccionó en trozos pequeños con una cuchilla VALET de --
afeitar; dichos trozos fueron colocados en un tubo conte
niendo OSMIO PALADE, con un pH 7,2 durante dos horas a -
una temperatura de 4°C.

También usamos como fijador OSMIO MILLONIG y OSMIO FOSFA-
TO MONOSODICO 0,18 M., pH 7,2 obteniendo los mejores re-
sultados y realizando la mayor parte de nuestro trabajo
con OSMIO PALADE, pH 7,2.

Una vez fijadas las pineales se precedió a la deshidrata
ción y antes de deshidratar se lavaron los bloques duran
te 10 minutos en la solución tampón.

Sin una deshidratación total es imposible una buena inclu
sión, aunque parece que los resultados no difieren si se
hace a una o dos concentraciones o a varias progresivas.

TECNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

Las técnicas de fijación en Microscopia Electrónica obedecen a los mismo principios que los utilizados en Microscopía Óptica, aunque con más exactitud y rigor.

Se preparan tres soluciones madre:

- Solución A.

Acetato sódico 0,14 M.

Acetato sódico 1,248 gm.

Agua destilada 100 c.c.

- Solución B.

Veronal sódico.

Veronal sódico 2,58 g.,.

Agua destilada 100 c.c.

- Solución C.

Acido clorhídrico 0,1 normal.

TECNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

Las técnicas de fijación en Microscopia Electrónica obedecen a los mismos principios que los utilizados en Microscopía Óptica, aunque con más exactitud y rigor.

Se preparan tres soluciones madre:

- Solución A.

Acetato sódico 0,14 M.

Acetato sódico 1,248 gm.
 Agua destilada 100 c.c.

- Solución B.

Veronal sódico.

Veronal sódico 2,58 gm.
 Agua destilada 100 c.c.

- Solución C.

Acido clorihídrico 0,1 normal.

El tampón se prepara mezclando las soluciones madre A, B y C en las siguientes proporciones:

10 c.c. de la solución A.

10 c.c. de la solución B.

10 c.c. de la solución C.

20 c.c. de agua destilada.

El fijador se prepara mezclando estemporáneamente volúme nes a partes iguales de la anterior dicha solución tampón con la de tetróxido de osmio, esta mezcla no conserva su estabilidad durante mucho tiempo, así que su utili zación debe ser inmediata a su preparación

Durante la fijación debe colocarse en el refrigerador.

Desde que se disecó la pieza y se introdujo en el fondo de un tubito de ensayo que contenía medio centímetro cúbico de solución fijadora, preparada como antes hemos in dicado, se lleva al refrigerador y se mantiene durante - dos horas a la temperatura de 4°C.

Para detener el proceso de fijación se efectúan lavados sucesivos con solución tampón.

DESHIDRATACION

Para realizar la deshidratación empleamos solución de acetona a distinta concentración, teniendo la siguiente pausa:

Acetona 30%	15 minutos
Acetona 50%	30 "
Acetona 70%	30 "
Acetona 70% + Acetato de Uranilo	12 a 24 horas
Acetona 90%	30 "
Acetona 100%	30 "
Acetona 100%	(dos pases de 30 minutos con SO ₄ Cu).

El sulfato de cobre se presenta en piedras de color oscuro muy duras, que requieren gran esfuerzo para triturarlas en el mortero.

Pensando en la posible absorción de agua por estas piedras, las introducimos una noche en la estufa, apareciendo, posteriormente, de un color azul más claro y fácilmente triturables.

Este polvillo se disuelve a saturación en acetona de 100%.

Pero así como las otras acetonas utilizadas eran corrientes, de marca Probus, la acetona de 100% que ha de unirse al sulfato de cobre, procuramos que sea Merck, es decir, lo más pura posible.

A continuación se realiza un paso intermedio entre la - deshidratación y la inclusión utilizando óxido de propileno, que actúa como sustancia puente sobre las acetonas y aralditas.

El propileno es muy tóxico e inflamable, por lo que puede sustituirse, sobre todo en verano, por acetona. Además con el calor los tapones de los tubos que contienen las piezas, saltan con gran facilidad, por ello es muy aconsejable etiquetar los tubos además de enumerar los tapones.

Utilizamos primero propileno durante dos horas haciendo un cambio de líquidos, comenzando seguidamente la utilización de esta sustancia, mezclada con Araldita I en las proporciones sucesivas de: 3:1, 2:2 y 1:3, con lo que comienza la inclusión.

INCLUSION

Como medio de inclusión hemos utilizado la Araldita (Durcupan Fluka) empleando Araldita I y II.

La Araldita está formada por la mezcla de resina epoxi, un derivado anhidro de un ácido dicarboxílico con cadena lateral alifática y ftalato de butilo que actúa como plastificante, disminuyendo así la fragilidad del bloque, - además de mejorar sus propiedades al corte.

La Araldita II está formada por una cuerda de resinas - igual que la anterior, a la que se añade, para acelerar la polimerización, un derivado fenólico con un grupo aminado.

La preparación de ambas se realiza de la siguiente forma:

Araldita II

<u>Componentes</u>	<u>Color distintivo</u>	<u>Propiedad del producto</u>	<u>Proporción</u>
B	Azul	Endurecedor	10 ml.
C	Amarillo	Acelerador	0,4 ml.
D	Verde	Plastificante	0,15 ml.
A/M	Rojo	Resina Epoxi	10 ml.

MARCHA DE LA INCLUSION

La inclusión se realiza mediante cambios sucesivos en -
los tubitos que contienen las piezas por los siguientes
elementos en el orden, proporción y tiempo que a continua-
ción se indica:

Oxido de propileno + Araldita I (3:1)	2 horas
Oxido de propileno + Araldita I (2:2)	2 horas
Oxido de propileno + Araldita I (1:3)	2 horas
Araldita I	4 horas (2 pares)
Araldita II	1 hora
Araldita II	48 horas (endure- cimiento)

Las piezas que han estado en Araldita II durante 2 horas,
se colocan en el fondo de las cápsulas que se llenan con
dicha Araldita.

Estas cápsulas son de plástico transparente, y deben per-
menecer en estufa a 70°C., un tiempo mínimo de 24 horas
antes de su utilización.

En el momento de colocar la pieza dentro de la cápsula -
debe procurarse una buena orientación de la pieza, cosa

55.-

que facilitará los cortes en las zonas de mayor interés.

Cerradas las cápsulas se dejan en estufa de 70°C. durante un tiempo mínimo de 48 horas para su endurecimiento.

SECCION Y MONTAJE DE LOS CORTES

Solidificada ya la Araldita se realiza el tallado de los bloques, haciendo un tronco de pirámide, en cuya cúspide se encuentra la pieza de tejido.

Para seleccionar la zona que deseamos estudiar hacemos - previamente controles al microscopio óptico.

Se realizan a continuación cortes ultrafinos con ultramicrotomo Reichert y LKB, mediante cuchillas de vidrio.

Los cortes empleados oscilan entre 400 y 600 Å de espesor, siendo recogidos en solución alcohólica al 10% y estirados por acción de vapores de cloroformo.

El montaje de los cortes se realiza mediante su recogida - por contacto sobre la superficie de una rejilla de cobre que se usa como porta-objetos, en la que previamente se ha bía depositado una película protectora, muy fina y uniforme de Forward.

Para la realización de esta membrana pueden utilizarse dos fórmulas distintas:

1º Cloroformo	50 c.c.
Forward	0,1 c.c.

57.-

2º	Dicloroetano	50 c.c.
	Forward	125 mgr.

(Esta última es la que nosotros hemos utilizado).

PREPARACION DE LAS MEMBRANAS

Para la preparación de estas membranas son necesarios los siguientes elementos:

- 1º.- Habitación con aire acondicionado a 20°C.
- 2º.- Mesa de mosaico blanco, con un espacio blanco para el cristalizador.
- 3º.- Luz apropiada.
- 4º.- Pinzas de pean lo más largas posibles,
- 5º.- Pinzas finas (de relojero) para las rejillas.
- 6º.- Portas, no es necesario que sean esmerilados.
- 7º.- Probeta de 100 c.c. con tapa.
- 8º.- Cristalizador grande.
- 9º.- Disponer de hojas de papel de seda.

MODO DE HACER LAS MEMBRANAS

- A.- Se pone agua destilada en el cristalizador hasta el -
borde y se cubre con papel de seda, para evitar que -
entren motas de polvo.
- B.- Se pone 50 c.c. de solución de forward en la probeta
tapándola con un pocillo de cristal.
- C.- Con las pinzas largas se coge un porta bien limpio, -
con un paño de hilo o nylon, y se introduce unos se--
gundos en el líquido de la probeta (con cuidado de no
mojar las pinzas en el líquido forward) se saca del -
líquido y para que escurra se deja un momento suspen-
dido sobre papel de filtro. Las dos caras del porta
tienen película (membrana) pero sólo se utiliza una.
- D.- Con la punta de una aguja de histología se hace una -
huella en todo el contorno de la película bordeando -
el porta, para que ésta puede desprenderse.
- E.- Se introduce el porta horizontalmente como flotando -
en el cristalizador. El agua va penetrando lentamen-
te entre película y porta, hasta que se desprende.
- F.- Desprendida la película, queda flotando la membrana.

Se debe utilizar para colocar las rejillas, la parte superior de la película, es decir la parte que se forma próxima a la pinza por ser más delgada.

G.- Rellenar la mitad de la membrana con las rejillas. -

"Las rejillas tienen dos caras, una brillante y otra mate". Debe ponerse, pues, la parte brillante en contacto con la película.

Una vez hecho esto, se toma otro porta bien limpio y se aplica horizontalmente sobre la membrana, que sobrenade con las rejillas en el cristalizador. La membrana se adhiere al porta, se profundiza y se saca. (Esta operación requiere mucho cuidado, buen pulso y una pinza muy fina).

H.- Se pone el porte, con la membrana y rejillas, en una campana que tenga en el centro un dispositivo para colocar oblicuamente los portas. Se desecan con sílica-gel y sílice anhidro. Se tiene en el desecador hasta que sea utilizado.

No es necesario cortar las membranas, pues ellas mismas se desprenden cuando se toman las rejillas para su uso.

61.-

Es importante señalar que el silicagel debe estar siem
pre azulado, cuando se torna de color rosa fuerte, -
vuelve a su color metiéndolo en estufa de 60° A. a 80°
C. Es decir, que puede ser recuperable.

Las rejillas que se emplean son de cobre.

TECNICA DE CONTRASTE PARA ULTRAFINOS CON NITRATO DE PLOMO

Extracto de Eduard J. Reynolds-Journal Cell Biology, 17-1-208-63.

Nitrato de plomo $\text{pb}(\text{NO}_3)$	1,33 gr.
Citrato de sodio $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$	2,76 gr.
(5 1/2 H_2O)	2,14 gr.
Agua destilada desmineralizada	30 c.c.

Modo de hacerlo.

Agitamos fuertemente durante un minuto y con intervalos durante 30 minutos para la conversión total del nitrato en citrato de plomo.

Posteriormente añadimos hidróxido sódico normal $\text{NOH}, 1\text{N}$...
..... 1 gr. en 25 c.c. de agua. Luego cogemos 8 c.c. de esta solución.

Esta solución debe estar exenta de carbonato.

Diluir hasta 50 c.c. con agua destilada y mezclar íntimamente por simple inversión. Primero se echa el Nitrato de plomo y después el Citrato de sodio.

Notas a considerar

- 1.- El ph de esta solución es normalmente de $12 \pm 0,1$ (es decir alcalino).
- 2.- La turbidez que pueda presentarse se elimina por centrifugación.
- 3.- La conservación de la solución debe hacerse en frasco de vidrio o de polietileno, en estas condiciones puede garantizarse su composición durante seis meses como máximo.
- 4.- Antes de emplear soluciones añejas es conveniente centrifugarlas.

Seguidamente, hicimos una nueva tinción de los cortes empleados con el fin de dar un mayor contraste al tejido, empleando una solución de citrato de plomo, nitrato de plomo, citrato sódico, hidróxido sódico 0,1 N y agua destilada, preparada según la fórmula de Reynolds (1963). Posteriormente, sumergimos las rejillas en esta solución durante 15-20 minutos. Evitando aquí la presencia de carbonato en la solución, ya que daría lugar a la formación de carbonato de plomo, dificultando así la visibilidad de los cortes celulares al precipitar sobre los mismos.

En este momento, se lavan los cortes en sosa 0,02 N y agua destilada, dejándolas secar antes de proceder a la introducción en el Microscopio Electrónico.

Para nuestras observaciones, hemos utilizado un Microscopio Electrónico Zeiss EM9A del Instituto Cajal.

Para las microfotografías hemos empleado placas de celuloi de Agfa Gevart Scientia 23-D-58. El positivado se realizó en una ampliadora Leitz II con papel Agfa y Negtor.

MICROSCOPIO OPTICO

Para teñir los cortes gruesos obtenidos de los bloques de Araldita lo hacemos con la siguiente solución:

Azul de toluidina	0,5 gr.
Borax,.....	0,5 gr.
Agua destilada	100 c.c.

Una vez de haber pesado estas cantidades se mezcla bien y se pone en un matraz aforado y tapado bien, hasta el momento de teñir. Esta solución sirve hasta el momento de su precipitación.

Los cortes de 2 micras cuando se van cortando van cayendo a una balsa de vidrio.

Después de echar unas gotas de azul de toluidina sobre los cortes de 2 micras, se deja unos diez minutos y de vez en cuando, el porta con los cortes encima, se pasa sobre una llama varias veces. Después se lava con agua destilada, alcohol de 96° y xilol.

Una vez que esté seco se echa una gota de Bálsamo de Canadá con una vara o aguja de histología para no ser derramado, - se pone un cubre limpiándolo con xilol con el objeto de proteger a los cortes de polvo e impurezas.

RESULTADOS CONTROLES

- 1º- Ratas Normales.- En los mamíferos la pineal tiene aparentemente un solo tipo de células parenquimatosas o pineocitos.

Los demás elementos parenquimatosos de este órgano neuroendocrino están constituidos por células de Schwann, células intersticiales, células de glía, células plasmáticas, fibrocitos, linfocitos y fibras musculares estriadas.

El pineocito de la rata se caracteriza por la gran riqueza de sus organoides, (fig. 1ª). Su núcleo es oval y con cromatina regularmente distribuida; dicho núcleo presenta un diámetro medio de cinco micras (fig. 1ª, 2ª, y 3ª, p).

En el citoplasma del pineocito se observan formaciones ribosómicas muy abundantes. El retículo endoplásmico granular y el retículo endoplásmico liso aparecen muy fragmentados, (fig. 2ª, Re 1), su proporción es abundante y de distribución citoplasmática homogénea. Los complejos de Golgi se encuentran dispuestos en forma circular hacia uno de los polos del soma y están constituidos por sacos aplanados, vacuolas y

vesículas, (fig. 1ª, 2ª y 8ª, Gc).

Uno de los elementos más discutidos que han adquirido mayor importancia en el pineocito de los mamíferos lo constituyen las prolongaciones y mazas terminales de los mismos (fig. 6ª y 7ª). En los pineocitos de la rata se distinguen en nuestro material tres tipos fundamentales: mazas perivasculares, claves pseudofoliculares y clavazas con vestigios rudimentarios de células fotorreceptoras. Las que tienen mayor interés por su gran número son las perivasculares caracterizadas por la presencia de vacuolas lipídicas, de mitocondrias y de formaciones vesiculares (fig. 6ª). Las vacuolas lipídicas no poseen una verdadera membrana limitante; en su lugar aparece una finísima granulación que describe el contorno de una membrana; en ocasiones estas vacuolas aparecen íntimamente unidas a formaciones mitocondriales que se disponen en torno a ellas a manera de gruesas láminas concéntricas, (fig. 1ª, 2ª, 3ª, 4ª y 5ª, Li).

Las mitocondrias son alargadas y muy estrechas, tienen una cámara externa muy clara, su membrana limitante - interna forma verdaderas crestas, (fig. 9ª, mt), a manera de pliegues sinuosos que limitan una cámara interna de gran densidad electrónica.

Intimamente vinculadas a la célula de Schwann se encuentra otro elemento denominado por algunos autores, (WOLFE, 1965), célula intersticial (nombre que no consideramos apropiado en cuanto pueda ocasionar confusión con las células intersticiales de CAJAL). Estas células se distinguen por su situación perivascular y también por encontrarse en las vecindades de las células de Schwann o en estrecha relación con las fibras nerviosas vegetativas; son células escasamente ramificadas, que disponen de un núcleo oval con cromatina granular y una carioteca sin invaginaciones, con una membrana interna más densa (fig. 10ª y 11ª).

En el citoplasma hay escasos ribosomas libres y un retículo endoplásmico rugoso muy dilatado con un aspecto casi vacuolar; las mitocondrias son pequeñas y muy densas, ovales y con escasas crestas; los complejos de Golgi son numerosos y bien desarrollados (Gc), disponen casi siempre de un cilio. Estas células solo se localizan en la glándula pineal de la rata.

La célula de Schwann se caracteriza por su mayor densidad electrónica. El núcleo, de aspecto arriñonado, presenta dos o tres escotaduras y un nucleolo muy espiralizado. La cromatina, adosada a la membrana interna de la carioteca, da a éste una apariencia más

osmiófila; su citoplasma es también denso con abundantes complejos de Golgi retículo endoplásmico rugoso y gránulos de pigmento (fig. 12^a, Sch).

Las fibras vegetativas, de aspecto arrosariado y con botones, ya sean terminales o de paso (fig. 12^a y 13^a), contiene abundantes vesículas granulares de unos 600 a 800 Å de diámetro, también se observa alguna vesícula granular mayor, de unos 900 a 1.200 Å, estas vesículas presentan un gránulo osmiófilo central y un halo periférico, electrónicamente transparente de 200 Å de diámetro, rodeados por una unidad de membrana, mitocondrias bien conformadas y neurofilamentos, (fig. 12^a y 13^a, Ax).

El capilar (fig. 14^a, 15^a y 16^a, Ca) adosado a los pineocitos de la rata contiene abundantes poros (Po) y un espacio pericapilar ocupado por una sustancia fundamental amorfa (Pe), prolongaciones nerviosas vegetativas (Ax) prolongaciones pineocíticas (P), células de Schwann y células intersticiales (IC), (fig. 17^a y 18^a).

RESULTADOS EXPERIMENTALES

2°.- Ratas gangliectomizadas.- Correspondiente a un animal sacrificado a los 15 días del postoperatorio en la figura 19^a destaca en el pineocito un núcleo hipertrófico de unas diez micras de diámetro , invaginado y con un nucleolo prominente (figs. 19^a y 20^a, N y n). La cromatina es más granulosa y densa. El pericarion generalmente es una estrecha banda citoplasmática - (figs. 19^a y 20^a) que presenta escasas mitocondrias bien formadas (figs. 19^a y 20^a, mt) y un retículo endoplásmico liso de aspecto tubular.

Las prolongaciones se caracterizan por una mayor riqueza en mitocondrias (figs. 21^a y 22^a, mt), aparentemente bien conformadas, que se disponen en torno a un área golgiana con aspecto dictiosómico muy disperso; es frecuente encontrar por una parte una serie de cuerpos densos muy osmíófilos (figs. 21^a y 22^a, cd) en los que difícilmente se advierte la unidad de membrana que los envuelve; otras veces se puede captar formasseudolisosómicas en forma de vacuolas (fig. 22^a, sl) rodeadas de una unidad de membrana y cuyo contenido heterógeno y abarca desde un contenido granuloso hasta masas osmíófilas mayores. También es frecuente localizar restos de elementos centriolares o

ciliares en las porciones centrales de estas áreas golgianas (fig. 22^a, rC). El resto del espacio citoplasmático se caracteriza por la existencia de un retículo endoplasmático rugoso y numerosos polisomas regularmente distribuidos.

Quizá el hallazgo más característico resida en la escasa presencia de vacuolas lipídicas en todas las células pineocíticas.

En la célula intersticial también encontramos una hipertrofia nuclear, un escaso pericarión y un complejo de Golgi escasamente desarrollados (fig. 23^a, Gc); en contraste con los pineocitos advertimos con frecuencia la presencia de una gran vacuola lipídica (figs. 23^a y 24^a li).

Los capilares aparecen enormemente dilatados con una actividad pinocítica normal (fig. 24^a, Ca); en el espacio pericapilar parece advertirse un reforzamiento de la membrana basal del capilar y no se observan fibras de tipo adrenérgico.

3°.- Ratas gangliectomizadas sometidas a ultrasonificación aguda.- En la (fig. 25^a) corresponde a un animal sacrificado inmediatamente después de la acción ultrasónica en aplicación única y a los quince días de la glangliectomía presentamos un aspecto panorámico en el que, junto a la población parenquimatosa epifisaria, aparece en mayor número que lo habitual un grupo de células intersticiales (Ic) en las proximidades de un vaso. Así mismo se advierte una célula de aspecto linfoblástico (Li). Los pineocitos presentan un volumen y una relación nucleocitoplásmica normales y lo mismo ocurre con su contenido lipídico. Los núcleos son sencillos con escasas invaginaciones y presentan una cromatina granulosa (fig. 26^a); los complejos de Golgi aparecen con aspecto dictiosómico muy esparcido con vacuolas, vesículas y algunos sacos aplanados (figs. 27^a y 28^a, Gc). El retículo endoplásmico liso ha evolucionado de su forma tubular hacia un aspecto vesicular, casi vacuolar (figs. 27^a, 28^a, 29^a y 30, r.e.l.); y las mitocondrias presentan un enorme polimorfismo con una enorme densidad electrónica en su cámara externa (figs. 28^a, 29^a y 30^a, mt); algunas imágenes mitocondriales con estrangulación sugieren que estas mitocondrias presentan una tendencia a la división (figs. 29^a y 30^a, mt). Algunas formaciones de retículo endoplásmico liso pre-

sentan en ocasiones en su superficie externa, acúmulos ribosómicos (fig. 32^a, r.e.l.).

En medio de las áreas golgianas se observan unas formaciones que parecen corresponder a restos de elementos centriolares (figs. 30^a y 31^a, rC) sin que se llegue a conformar verdaderos centriolos.

Las vacuolas lipídicas presentan modificados su aspecto en cuanto a organización y formación; los bordes son difusos y yuxtapuestos a dicho contorno se observan ribosomas, formaciones visculares de retículo endoplásmico liso y mitocondrias (figs. 32^a y 33^a, li). En las clavas pseudofoliculares se alternan formaciones de retículo endoplásmico rugoso con las del retículo endoplásmico liso (fig. 34^a, 4.e.r.)

Un hallazgo constante y repetido en este grupo experimental es la presencia de elementos linfocíticos que unas veces aparecen en el interior de los capilares; son células con escasos organoides, presentan habitualmente un complejo de Golgi, pocas mitocondrias, ovaless con escasas crestas, escaso retículo endoplásmico liso vesicular, ribosomas y microfibrillas (figs. 35^a y 37^a, li); también aparecen estos elementos en el espacio pericapilar, situándose entre los pineocitos y

y las células intersticiales (figs. 35^a y 36^a, Li). En los endotelios capilares (figs. 37^a y 41^a, Ca) destacaremos preferentemente la gran actividad exocítica de sus células.

Las células intersticiales presentan un amplio complejo de Golgi (figs. 38^a, 39^a y 40^a, Gc) y generalmente una enorme vacuola lipídica (figs. 39^a y 40^a, li), se trata de células localizadas en la vecindad de los vasos y en medio de los pineocitos.

4°.- Ratas sometidas a ultrasonificación crónica.- En la figura 42^a y 43^a correspondientes a un animal sacrificado a los quince días, después de la acción ultrasónica diaria se observa un pineocito con núcleo prominente (figs. 42^a y 43^a, N y nu) con carioteca irregular y sin invaginaciones, se advierte una ligera sombra paranucleolar y una cromatina granulosa y dispersa que no presenta acúmulos bajo la carioteca. Este núcleo aparece un poco polarizado, por lo que en ocasiones aparece un pericarión escaso con algunas mitocondrias aparentemente bien conformadas, alargadas, con una matriz densa (fig. 42^a, s1) de aspecto oval que contienen una sustancia amorfa algo densa a los electrones y rodeados por una unidad de membrana y -

casi del tamaño de una mitocondria.

En otras ocasiones este pericarión es amplio con numerosas mitocondrias, algo polimorfas, con crestas irregularmente dispuestas y con matriz densa (fig.43^a, mt) un complejo de Golgi, con buen desarrollo aparece formado por vacuolas y vesículas (fig. 43^a, Gc)

Es de señalar junto al polimorfismo mitocondrial la presencia de los cuerposseudolisosómicos (fig.44^a, sl) que en ocasiones hace difícil su distinción con los elementos mitocondriales; el resto del suelo citoplásmico aparece ocupado por formaciones de retículo endoplásmico liso de tipo tubular y numerosas polisomas.

En la figura 45^a, advertimos la misma secuencia de fenómenos, a las que se vienen a añadir distintos graduaciones de formaciones vacuolares lipídicas (fig. 45^a, li).

La célula intersticial no presenta rasgos morfológicos destacables (fig. 46^a, Ic) en la imagen aparece junto a un pineocito en el que destaca el enorme desarrollo de su núcleo.

Los capilares (fig. 47^a, Ca) presentan un espacio pericapilar ocupado por una sustancia fundamental amorfa que en forma de grumos, parece ocupar también la porción intracitoplásmica de la célula endotelial adyacente (fig. 47^a, pe).

5°.- Ratas gangliectomizadas sometidas a ultrasonificación crónica.- La actividad metabólica del pineocito es evidente en la figura 48^a, advertimos en primer término en esta figura una hipertrofia, del núcleo y del nucleolo (fig. 48^a, N y nu), el resto de la cromatina granulosa y densificada se distribuye homogéneamente, sin yuxtaponerse a la carioteca. Las invaginaciones son escasas.

En el citoplasma destaca un condrioma polimorfo y de diferente tamaño, con matriz densa (fig. 48^a, mt) que parece evolucionar progresivamente hacia formas pseudolisosómicas (fig. 48^a, sl); el complejo de Golgi fragmentado y dictiosómico aparece inmerso en esta área citoplásmica en donde también se advierten formaciones de retículo endoplásmico liso, de tipo tubular y numerosas polisomas.

En la figura 49^a es más evidente esa graduación del

condrioma (fig. 49^a, mt) hacia formaciones sacularesseudolisosómicas con un contenido heterogéneo.

En la figura 50^a, estas formacionesseudolisosómicas presentan un mayor contenido heterogéneo con porciones osmiófilas y de aspecto lipídico (fig. 50^a, sl) inmersa en las proximidades de un área golgiana enriquecida por un retículo endoplásmico rugoso.

El retículo endoplásmico liso tubular es abundante y su contenido con mayor densidad electrónica, unido a los polisomas; da un mayor oscurecimiento al pineocito.

Un hallazgo no destacado en la literatura en torno a la pineal es la observación en este caso de la existencia de una serie de canaliculos (fig. 50^a, Ca.) con sus uniones estrechas (fig. 51^a, Ue) que complica un poco más la fisiología de este órgano.

En la figura 51^a aparecen dos pineocitos con gran desarrollo de sus núcleos y en medio una célula intersticial (Ic) con un núcleo de cromatina densa que refuerza la membrana interna de la carioteca y un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado y con abundantes polisomas.

Esta célula intersticial, también almacena en su citoplasma formaciones pseudolisosómicas, heterogéneas osmiófilas, (fig. 52^a, sl).

En el espacio pericapilar subyacente no se aprecian fibras adrenérgicas (fig. 52^a, pe) y los vasos presentan las mismas características del grupo anterior.

6°.- Ratas gangliectomizadas sometidas a la acción del frío en aplicación única.- En un aspecto panorámico podemos observar una serie de pineocitos con núcleos invaginados (fig. 53^a, N) entre cuyos elementos se distinguen varias células intersticiales de gran densidad electrónica nucleocitoplásmica y dilatación de su retículo endoplásmico rugoso, siempre en las proximidades de los espacios pericapilares y en contacto con elementos axónicos adrenérgicos.

Las mitocondrias del pericarión del pineocito (fig. 54^a y 55^a, mt) aparecen bien conformadas con su aspecto alargado, numerosas y regularmente distribuidas conservando estas características en las prolongaciones epifisarias (fig. 56^a, mt); el retículo endoplásmico liso y rugoso en este mismo pericarión presenta un aspecto tubular y fragmentado y el de tipo liso

se hace vesiculoso en las prolongaciones (fig. 56^a, r.e.l.).

El complejo de Golgi es abundante e hipertrófico - (figs. 55^a, 56^a y 57^a, Gc) y aparece constituido por sacos aplanados, vacuolas y vesículas, algunas de tipo espinoso.

Cabe destacar preferentemente en las prolongaciones formaciones de retículo endoplásmico rugoso (fig. 58^a, r.e.r.). con extremos dilatados en forma de sacos con tendencia a convertirse en retículo endoplásmico liso y que parecen establecer íntimas relaciones con vacuolas lipídicas. (figs. 59^a y 60^a, li).

En las claves o polos terminales, se hacen más evidentes y numerosas las formaciones de retículo endoplásmico liso en forma vesicular, casi sacular, (figs. 61^a y 62^a) y las vacuolas lipídicas (figs. 61^a y 62^a, li) parecen condensar en torno suyo, las formaciones mitocondriales; que se yuxtaponen, empequeñecen, aumentando su densidad electrónica (figs. 61^a y 62^a, mt), lo que permite que se diferencien e identifiquen claramente estas claves terminales perivasculares.

En las claves terminales pseudofoliculares, los elemen-

tos mitocondriales y lípidos son escasos y aparecen en mayor número formaciones de retículo endoplásmico liso vesicular y restos ciliares (fig. 63^a, rC), así mismo las uniones estrechas son frecuentes. (fig. 63^a Ue).

Las células intersticiales (figs. 64^a y 65^a) presentan como característica reseñable una dilatación de su retículo endoplásmico rugoso y un complejo de Golgi hipertrófico (figs. 64^a y 65^a, Gc).

Los capilares de aspecto sinusoidal (fig. 66^a), aparecen colapsados con gran actividad exocítica y con modificaciones sustanciales en su inervación adrenérgica (fig. 66^a, Ax) y en los que a imágenes en mayor aumento parecen observarse en sus botones, algunos seudolisosomas y cuerpos densos (fig. 67^a, Ax).

Los capilares simples y estrechos (fig. 68^a) aparecen contraídos, con su componente celular de gran densidad electrónica y escasa actividad exocítica y endocítica; en esta misma figura se advierte una célula de naturaleza macrofágica.

7². - Ratas sometidas a la acción del frío en aplicación reiterada crónica. - Las características más abundan-

tes de los pineocitos residen en el gran oscurecimiento observado en el núcleo y en el citoplasma (fig. - 69^a) con alargamiento del eje celular.

El núcleo presenta un nucleolo grueso y compacto (fig. 69^a, nu); en el citoplasma aparecen algunas vacuolas lipídicas (fig. 69^a, li) y las mitocondrias son alargadas y típicamente conformadas (fig. 69^a, mt).

Otros pineocitos presentan un núcleo más activo (fig. 70^a, nu) y formaciones en su pericación de retículo endoplásmico rugoso (fig. 70^a, r.e.r.).

Algunos pineocitos como los de la figura 69^a, contrastan grandemente por su núcleo invaginado y un nucleolo grande (fig. 70^a, nu).

El condrioma en estas células presentan una apariencia normal, aspecto alargado, crestas transversales (fig. 72^a, mt) numerosas formaciones de retículo endoplásmico liso (fig. 72^a, li) y polisomas.

La célula intersticial presenta un núcleo globuloso (fig. 71^a y 73^a, Ic) y sus características relaciones con las fibras adrenérgicas (fig. 73^a, Ax). El resto de los componentes y organoides no presentan modificaciones ultraestructurales dignas de interés.

82.- Ratas gangliectomizadas sometidas a la acción del -
frío en aplicación reiterada crónica.- En la fig. -
74^a, se observan un núcleo (N) y un nucleolo (nu) -
prominente; la cromatina granular sin ningún rasgo -
característico; en el pericarión aparece un complejo
de Golgi escasamente desarrollado (fig. 74^a, Gc) el
condrioma, retículo endoplásmico liso es escaso (fig.
74^a y 75^a, mt).

Las clavav terminales perivasculares casi no presen-
tan vacuolas lipídicas (figs. 76^a y 78^a. Pt) y el -
contenido numérico del condrioma es variable y poli-
morfo (figs. 76^a y 78^a, mt) y se advierten formacio-
nes de retículo endoplásmico liso vesicular (fig. -
76^a, r.e.l.) y formaciones pseudolisosómicas (fig. 76^a
sl).

La célula intersticial (fig. 77^a, Ic) presenta un re-
tículo endoplásmico rugoso dilatado y pseudolisosomas
(fig. 77^a, r.e.r. y sl).

Los capilares presentan escasa actividad pinocitósia-
ca y abundante evaginaciones intraluminares (figs. -
77^a y 78^a) el espacio pericapilar (figs. 77^a y 78^a,
pe) presenta depósitos de sustancia fundamental amor-
fa.

92.- Ratas gangliectomizadas sometidas a marchas forzadas en experimento agudo.- En las figuras 79^a y 80^a presentamos aspectos panorámicos de pineocitos en los que destacan algunos núcleos invaginados dispuestos en forma de rosetas en torno a un capilar (figs. 79^a y 80^a Ca) y en el que también cabe señalar la presencia de un pineocito binucleado que presenta dos estrechamientos (figs. 79^a y 80^a, Pb) por acción del paso de elementos vasculonerviosos y como aspectos generales a destacar es la existencia de un retículo endoplásmico liso y vesicular y la abundancia del condrioma.

El núcleo del pineocito es granuloso y presenta un pequeño nucleolo (fig. 81^a, N) en el pericarión se observa escaso retículo endoplásmico rugoso y en la célula contigua destacan el retículo endoplásmico liso, unas mitocondrias polimorfas que parecen sufrir un proceso de dicotimización y división que se hace más evidente en la figura 82^a (mt) en esta misma figura se advierte más claramente ese aspecto casi macrovesicular del retículo endoplásmico liso (r.s.l.).

A nivel de sus prolongaciones se advierte también esta gran riqueza mitocondrial (figs. 83^a y 84^a, mt) con su gran polimorfismo, dicotomización y aparente división; el complejo de Golgi en estas áreas (Gc)

se visualiza en forma dictiosómica y constituido en su mayor parte por vesículas y vacuolas y en su centro golgiano se notan raicillas ciliares (fig. 83^a, Gc) con su típica estriación y restos de elementos - centriolares o ciliares (figs. 83^a y 84^a, rC).

Hacia los polos o clavas terminales pseudofoliculares persiste la gran abundancia mitocondrial (fig. 85^a, mt) y el gran desarrollo del complejo de Goldi (Gc) que se manifiesta con aspecto dictiosómico.

En las clavas terminales perivasculares las vacuolas lipídicas son grandes (fig. 86^a, li) y mantienen íntimas relaciones con unas mitocondrias, empequeñecidas con escasas crestas y una matriz granulosa, retículo endoplásmico liso macrovesicular.

Las células intersticiales aparentan presentar un reducido pericarión (figs, 87^a, 88^a y 89^a, Ic) con un complejo golgiano escasamente desarrollado y vacuolas lipídicas pequeñas y escasas; se advierte por otra - parte la presencia de elementos linfoblásticos junto a estas células y en el espacio perivascular (figs. 87^a y 90^a, li).

Los botones adrenérgicos presentan fenómenos dégenera

tivos, un mayor volumen que lo habitualmente y también mayor contenido multivesicular osmiófilo (figs. 90^a y 91^a); los capilares no presentan rasgos interesantes y destacables, (fig. 91^a, Ca).

10². - Ratas gangliectomizadas sometidas a un experimento - crónico. - En la figura 92^a se observa un suelo citoplásmico rico en formaciones de retículo endoplásmico liso vesicular y tubular y polisomas, escaso retículo endoplásmico rugoso; mitocondrias numerosas y globulosas con matriz densa (fig. 92^a, mt) algunas de las cuales parecen evolucionar hacia seudolisosomas (fig. 92^a, sl); el complejo de Golgi, aparece escasamente desarrollado (fig. 92^a, Gc).

La célula intersticial presenta un núcleo oval y voluminoso (figs, 93^a y 94^a, Ic) si hallazgos específicos en su citoplasma.

Los capilares con luz amplia (figs. 95^a y 96^a, Ca) - no presentan actividad pinocitósica, pero si abundantes poros; en torno al espacio pericapilar no se aprecian fibras adrenérgicas y sí, un depósito irregular de sustancia fundamental amorfa (figs. 95^a y 96^a, pe).

DISCUSION

Existe una serie de factores que regulan la función pineal; entre estos factores se encuentran los stress y la acción de la temperatura ambiental (REITER y FRASCHINI, 1919); a pesar del criterio de REITER y Cols (1971) que establecen que la glándula pineal del hamster dorado es más sensible en sus condicionamientos neuroendocrinos que la rata blanca no existen adecuadas explicaciones a este respecto.

Durante los últimos quince años, los estudios comparativos del contenido de melatonina y serotonina de glándulas pineales normales de ratas oftalmoenucleadas, gangliectomizadas y sometidas a efectos de luz y oscuridad continua, han establecido que la inervación simpática de la glándula pineal controla el ritmo diario de su contenido en serotonina y melatonina en respuesta a la luz ambiental WURTMAN, - AXELROD y KELLY 1968, (GONZALEZ G. y COLS, 1969). Ha sido establecido por otra parte que las fibras que inervan la pineal contienen en sus terminaciones adrenalina y noradrenalina (PELLEGRINO DE IRALDI y ZIEHER, 1965; QUAY, 1963) y que estas sustancias actúan y ejercen una serie de acciones sobre los pineocitos.

Los trabajos de KAPPERS (1969) sugieren que las fibras adrenérgicas de la pineal ejercen su efecto sobre los pineocitos por dos vías diferentes.

1^a Por una acción lenta a través de la secreción de neuro transmisores en el espacio pericapilar, desde donde alcanzan los pineocitos por difusión.

2^a Por una acción rápida a través de las sinápsis entre - las terminaciones nerviosas y los pineocitos (GONZALEZ G. y Cols 1969), esta última acción podría establecer que las fibras adrenérgicas facilitan o inhiben el vaciamiento de las indolaminas almacenadas en los pineocitos hacia los vasos sanguíneos (ARSTILA y Cols. 1971); (GONZALEZ G. y BLAZQUEZ E. 1975).

Para establecer algunos de estos hechos, hemos sometido - varios lotes de ratas blancas de la cepa Wistar machos y prepúberes: normales y gangliectomizados (cervical superior) a la acción de distintos agentes físicos: ultrasonido, frío y movimientos giratorios en experimento agudo y en experimento crónico. Hemos omitido algunas de las fases experimentales tales como los efectos agudos en ratas normales ya que sus resultados no fueron bastante concluyentes.

El efecto de la gangliectomía bilateral del ganglio cervical superior ha sido abordado ampliamente en el estudio de la inervación de la glándula pineal en los mamíferos; desde CAJAL quedó establecido que esta inervación procede del ganglio simpático cervical superior, hecho que fué - confirmado con la práctica de la gangliectomía correspon-

diente (RODIN y TURNER. 1965), y (ROMIJN H.J., 1973, a, b y c).

Los hallazgos efectuados en este sentido, por nosotros, en la pineal de la rata no son superponibles a los descritos por QUAY (1956) y ROTH y Cols (1962) en ratas sometidas a la acción de la oscuridad.

En este lote encontramos una gran hipertrofia nuclear y nucleolar y en el citoplasma celular la característica más acusada es la presencia de unos cuerpos densos y de unas formaciones pseudolisosómicas; la damos tal denominación ya que no los podemos admitir plenamente como lisosomas auténticos hasta que no se establezca su verdadera naturaleza, a través del pertinente estudio histoquímico.

Muchas de estas imágenes pseudolisosómicas son similares a las descritas por DE DUVE y WATTIAUX (1966) tanto en células normales, como en células con procesos de digestión intracelular, de defensa contra bacterias, virus y otros agentes, en malas condiciones de nutrición celular, en diferenciaciones celulares, mitosis etc.

En nuestro caso, la aparición de estas formaciones pseudolisosómicas, llevaría implícito el ir asociados a desórdenes producidos por un mayor grado de sensibilidad de la glándula pineal, por la acción de la gangliectomía; estas condi-

ciones experimentales son usualmente más complejas y sería necesario un estudio detallado dirigido especialmente a este tema de la vía neural retino-hipotalámica, ganglio cervical superior y glandula pineal.

La escasa presencia de vacuolas lipídicas es notoria en esta fase experimental; PROP (1965) sugiere que los lípidos intervienen activamente con la función pineal y que la actividad de la HIOMT está vinculada a estas vacuolas lipídicas, lo que podría sugerir que esta sustancia es segregada con las inclusiones lipídicas (GONZALEA G. y BLAZQUEZ E. - 1975).

En relación al grupo de ratas gangliectomizadas sometidas a ultrasonicación aguda, no hemos podido encontrar dato bibliográfico alguno en este tipo de experimentación y, entre los hallazgos más característicos, se encuentran la presencia de un retículo endoplásmico liso de aspecto macrovesicular, en torno a los cuales se puede discutir su posible formación por acción de los mismos aldehidos o tampones utilizados, hecho no fácilmente explicable en nuestra fase experimental ya que realizamos toda la fase de fijación en el mismo día; recordemos la activa participación de este organoide en la síntesis de esteroides; aparece igualmente un polimorfismo mitocondrial con aparente secuencia de segmentación y división de estos elementos. Como -

dato y hallazgo en este grupo experimental tenemos la aparición de elementos linfocitarios, MARSHALL y DAYAN (1964) al describir el tumor de la pineal, señalan dos tipos celulares en la conformación de esta neoformación y uno de estos elementos celulares corresponde al linfocito. Estos autores explican la presencia de este elemento en estos tumores como una posible reacción inmunológica. En nuestro caso podría tratarse de una simple reacción a la acción de los efectos ultrasónicos.

En el grupo de ratas sometidas a efectos ultrasónicos crónicos, también se observan con gran frecuencia los cuerpos pseudolisosómicos, lo que sugiere una gran sensibilidad del pineocito a la acción de estas injurias por agentes externos de tipo físico y en este curso el origen parece derivarse del complejo mitocondrial; el espacio pericapilar de esta glándula aparece ocupado por una sustancia fundamental amorfa, que podría actuar a modo de barrera bloqueante entre pineocito y vaso.

En las ratas gangliectomizadas con efectos ultrasónicos crónicos, es evidente la hipertrofia nuclear y nucleolar y en este caso el contenido de los cuerpos pseudolisosómicos es más heterogéneo con la presencia de área osmíofila y de naturaleza lipídica que se disponen en torno a un canalículo bien tipificado, que nos llevaría a aceptar como otra vía más de la secreción epifisaria, hallazgo que no

hemos observado citado en la literatura mundial Y es -
de señalar también que esa gran actividadseudolisisósomica
se hace patente igualmente en las células intersticiales.

En cuanto a los hallazgos obtenidos por nosotros en el lo
te de ratas gangliectomizadas sometidas a la acción del
frío agudo, se apreciaba una hipertrofia del complejo de -
COLGI no así un aumento de las barras sinápticas.

Por otra parte se apreciaba una proliferación de retículo -
endoplásmico rugoso en las prolongaciones que se continua
hacia sus extremos en forma de sacos dilatados de retícu-
lo endoplásmico liso y en donde parecen esbozarse sínte-
sis de sustancias lipídicas que participan activamente en
la formación de la melatonina (GONZALEZ G. y BLAZQUEZ E.
1975).

En las clavas o polos terminales perivasculares se advier-
te una fuerte tendencia a la degeneración mitocondrial en
donde este condrioma parece fundirse con las vacuolas li-
pídicas existentes en esta zona; este aspecto de las cla-
vas también se puede apreciar en glándulas pineales norma-
les como un factor de envejecimiento celular (GONZALEZ G.
y Cols. 1969).

Los capilares de la glándula pineal presentan un efecto -
vaso-constrictivo con escasa función pinocítica.

En estas ratas sometidas a la acción del frío (crónico) - la actividad metabólica en su núcleo y presencia de vacuolas lipídicas pero sin que el condrioma sea numeroso y no se observen cuerposseudolisosómicos.

En este mismo grupo pero con ratas gangliectomizadas; a pesar de la hipertrofia nuclear y nucleolar, el complejo de Golgi aparece escasamente desarrollado, no se observan vacuolas lipídicas en el pericarión lo mismo que en las clavas terminales donde predominan las formaciones de retículo endoplásmico liso vesicular y pseudolisosomas.

En el lote de ratas gangliectomizadas sometidas a marcha forzada aguda existe un notable aumento del condrioma con tendencia al polimorfismo y a la división y un retículo endoplásmico macrovesicular; las prolongaciones epifisarias presentan una gran actividad y en la que junto a los elementos anteriores se añade un complejo de Golgi bien desarrollado; las clavas terminales presentan también una gran actividad con la presencia de grandes vacuolas lipídicas que presentan condrioma en torno suyo, que parece fundirse en su superficie externa; es de señalar también en este lote la aparición de elementos linfoblásticos.

En el grupo de ratas sometidas a marcha forzada crónica,

no destacan hechos sustanciales a nivel morfoultraestructural ya que parece existir una mayor adaptabilidad de la rata a este tipo de injuria.

En ratas gangliectomizadas y sometidas a marcha forzada - crónica, destacan el gran desarrollo de su condrioma, unido a la presencia de cuerpos seudolisosómicos.

CONCLUSIONES

El efecto de la acción de los agentes físicos (ultrasonidos, frío y marcha forzada) en ratas blancas machos prepúberes, de la cepa Wistar: normales y gangliectomizadas - del simpático cervical superior, sobre la morfología, el tamaño, el número y distribución de los organoides de la glándula pineal ha sido estudiada ultraestructuralmente, con los siguientes resultados.

- 1º Ratas glangliectomizadas.- Señalamos la gran hipertrofia nuclear con invaginaciones y nucleolo prominente del pineocito; con una cromatina granulosa y densa. Las prolongaciones se caracterizan por un abundante condrioma cuerpos densos y pseudolisosómicos cuyo contenido es heterogéneo, presenta escasa formación de vacuolas lipídicas.
- 2º Ratas gangliectomizadas sometidas a agentes ultrasónicos agudos.- La célula epifisaria aparece con un abundante condrioma polimorfo y con tendencia a la dicotomización y partición, un complejo de Golgi bastante desarrollado con un retículo endoplásmico liso y vacuolas lipídicas en distintos grados de organización y de formación y presencia frecuente de elementos linfocitarios intravasculares y extravasculares.

- 3º Ratas sometidas a agentes ultrasónicos crónicos.- El pineocito presenta un abundante condrioma polimorfo - que parece evolucionar hacia formasseudolisosómicas, un complejo de Golgi bien desarrollado y vacuolas lipídicas en distintas gradaciones; se aprecian fuertes depósitos de una sustancia fundamental amorfa pericapilar.
- 4º Ratas gangliectomizadas sometidas a agentes ultrasónicos crónicos.- Presenta el pineocito una hipertrofia del núcleo y del nucleolo, no se observan invaginaciones; en el citoplasma se observa un condrioma polimorfo y de diferente tamaño con matriz densa que parece evolucionar hacia formasseudolisosómicas, estas últimas formaciones son más heterogéneas en su contenido, es así mismo abundante el retículo endoplásmico liso y los ribosomas. Se describe por primera vez en la glándula pineal de los mamíferos la presencia de canales intercelulares.
- 5º Ratas gangliectomizadas sometidas a la acción del frío agudo.- Presenta el pineocito, un complejo de Golgi hipertrófico y abundantes formaciones de retículo endoplásmico rugoso que evolucionan hacia sacos dilatados de retículo endoplásmico liso y que parecen corresponder a zonas de síntesis lipídicas; las clavav o po

los terminales presentan gran actividad catabólica - con tendencia a la degeneración.

6² Ratas sometidas a la acción del frío crónico.- El pineocito presenta gran oscurecimiento de su núcleo y de su citoplasma, presenta vacuolas lipídicas, un buen desarrollo del condrioma y del complejo de Golgi y numerosas formaciones de retículo endoplásmico liso y polisomas.

7² Ratas gangliectomizadas sometidas a la acción del frío crónico.- Gran desarrollo del núcleo y nucleolo; poco desarrollado su complejo de Golgi, condrioma y retículo endoplásmico liso; las clavav terminales son pobres, no presentan vacuolas lipídicas y sí, algunas formaciones pseudolisosómicas.

8² Ratas gangliectomizadas sometidas a la acción de marcha forzada aguda.- Existe en este tipo de pineocito un abundante condrioma en fase dicotomización y partición, que se hace más evidente hacia las prolongaciones y clavav terminales, con gran desarrollo en estas últimas zonas del complejo de Golgi; en las clavav terminales se observa gran actividad lipídica con mitocondrias yuxtapuestas en torno suyo, disminuidas de tamaño y densas que parecen fundirse con estas inclusiones lipídicas.

9° Ratas gangliectomizadas sometidas a la acción de marcha forzada crónica.- Gran componente mitocondrial polimorfo que parece evolucionar hacia cuerpos pseudo-lisósomas; complejo de Golgi escasamente desarrollado y la gangliectomía parece condicionar la acción de los movimientos sobre el pineocito.

Parece razonable sugerir que la ultraestructura del pineocito puede ser modificada por acción de agentes físicos - (en los experimentos crónicos) debido a la liberación asociada de catecolaminas por la médula suprarrenal y el sistema nervioso simpático o directamente por descargas simpáticas en la glándula pineal.

Se sugiere como explicación plausible que las catecolaminas circulantes liberadas por acción de estos agentes físicos (en los experimentos crónicos) y la descarga simpática producida por estos mismos agentes parecen producir modificaciones de la imagen ultraestructural en el pineocito de la glándula pineal de la rata blanca. Sin embar-

go también parece evidente que dichas modificaciones se - hacen más profundas o aumentan e incluso se traducen en - aspectos degenerativos, si a estos agentes físicos (en experimentos agudos y crónicos) se añade una denervación de esta glándula pineal.

Los nervios procedentes del ganglio simpático cervical superior actuarían a través de un sistema de retro-alimentación protegiendo a la glándula pineal contra las catecolaminas circulantes liberadas por la médula suprarrenal o el sistema nervioso simpático, por acción de estos agentes físicos (ultrasonido, frío y marcha forzada), por lo que podríamos sugerir la enorme importancia que parecen tener estas fibras simpáticas en la regulación de la aparente sensibilidad de la glándula pineal de las ratas a la acción de dichos agentes.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- ACHUCARRO N. y SACRISTAN J.M.: "Investigaciones histológicas e histopatológicas sobre la glándula pineal humana". Trab. de Lab. de Inv. Biol 10, 185-208, 1912.
- 2.- ACHUCARRO N.: "La estructura secretora de la glándula pineal humana". Soc. esp. de Biol., 1913.
- 3.- ALTNER H.: "Histologische und Histochemische Untersuchungen an der Epiphyse von Haien". Prog. Brain Res., 10: 155-171, 1965.
- 4.- ANDERSON E.: "The anatomy of bovine and ovine pineals light and electron microscopic studies". Journal of Ultraestructure Research Suppl. 8: 5-76, 1965.
- 5.- ARSTILA A.V. y HOPSU.: "Studies on the rat pineal gland. I. Ultraestructure". Ann. Acad. Sci. Fenn. Ser. A.V. 113-1-21, 1964.
- 6.- ARSTILA A.U.: "Electron microscopic studies son the

structure and structure and histochemistry of the pineal gland of the rat" Neuroendocrinol., Suppl. 6 1-101, 1967.

- 7.- ARIENS KAPPERS, J. "Innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. Record 136, 220, - 221, 1960.
- 8.- ARIENS KAPPERS, J. "Survey of the innervation of the epiphysis cerebri and the accessory pineal organs of vertebrates. Brain Res. 10, 87-153, 1965.
- 9.- AXELROD J. y WEISSBACH H.: "Purification and properties of Hydroxyindol-o-methyltransferase". J. Biol. Chem. 236-271, 1961.
- 10.- AXELROD, J. SHEIN, H.M. and WURTMAN, R.J. "Stimulation of C¹⁴- melatonin synthesis from C¹⁴-tryptophan by noradrenaline in rat pineal in organ culture". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 62: 554-559 (1969).
- 11.- BERTLER A., FALCL B. y OWMAN C.: "Studies on the 5-hydroxytryptamine - atores in the pineal gland of the rat" Acta Physiol. Scand. 63, Suppl. 234-18, 1964.

- 12.- BIONDI: "Histologische Beobachtungen an der -
Zirbeldrüse". Neurol. u Psychiatric.
Bd. IX H. 1, 1912.
- 13.- BIZZOZERO: "Sul parenchima della ghiandola pinea
le". R. Ist. Lombardo di Science e Le-
tture. Tome I (1868).
- 14.- BIZZOZERO: "Beitrag zur Kenntniss des Baues des
zirbeldruse". Centralbl. F.D. med. -
Wissenschaft. (1891).
- 15.- BONDAREFF W.: "Submicroscopic morphology of granular
vesicles in sympathetic nerves of rat
pineal body". Z. Zellforsch. 67: 211-
218, 1965.
- 16.- CAJAL S.R.: "Histologie du système nerveux de l'
homme et des vertèbres". Vol. I. Paris:
A. Maloine: 191 Reimpress. Madrid, -
Inst. Cajal, 1955.
- 17.- CIONINI: "Sulla struttura della ghiandola pi-
neale". Riv. speriment. di Freniatria e
di med. legale Vol. II, 1885.
- 18.- CLARKE, J.L.: "Notes of researches on the intimate

structure of the brain; structure of the pineal gland". Proc. Roy. Soc. II, 1862.

- 19.- COLLIN, J.P. y KAPPERS, J.A.: "Electron microscopic study of pineal innervation in lacertilians". Brain. Res. II, 85, 106, 1968.
- 20.- CUTORE, C.: "Il corpo pineale di alcuni mamiferi". Archivio di Anatomia e di Embriologia. Fac. 3 y 4, Vol. IX, 1911.
- 21.- DEL RIO-HORTEGA: "Constitution histologique de la glande pineale. I. Celules parenchymateuses". Trab. de Lab. de Inv. Biol. 21: 95-141, 1923.
- 22.- DEL RIO-HORTEGA: "Anatomía microscópica del cuerpo pineal". Extracto de las conferencias y reseñas científicas de la Real Sociedad española de Historia Natural. Tm. I, 113 a 134, 1926.
- 23.- DE MARTINO C., TONIETTI G., y ACCINI : "Electron Microscopic study of immature and adult rats pineal body". Experimentia, 20: 556-557, 1964.

- 24.- DE ROBERTIS E.: "Histophysiology of synapses and neurosecretion". In: P. Alexander and Z. M. Bacq. Int. Ser. Monogra. Pure and Appl. Biol. Vol 20: Oxford, Pergamon Press, 1964.
- 25.- DE ROBERTIS y FRANCHI C.: "Electron observation on synaptic vesicles in synapses of the retinal rods and cones". J. Biophys. Biophys. cytology 2: 309-318, 1956.
- 26.- DE ROBERTIS y PELLEGRINO DE IRALDI. : "Plurivesicular secretory processes and nerve endings in the pineal gland". J. Biophys. Biochem. Cytol 361, 10, 1961.
- 27.- DIMITROWA: "Recherches sur la structure de la glande pituitaire chez quelques mammifères". Le Nevraxe, Vol. II Pag. 3,(1901)
- 28.- DUNCAN D.G. y MICHELETTI G.: "Notes on the fine structure of the pineal organ of cats". Biol. Med. 24: 576-587, 1966.
- 29.- DUVE, B.C. y WATTIAUX, R.: "Functions of lysosomes. Annual Review of physiology. Vol. 28. 435-492 (1966).

- 30.- EAKIN, R.M.: "Development of the third eye in the lizard *sceloporus occidentalis*. Rev. Suisse Zool. 71, 267-285, 1964.
- 31.- EAKIN y STEBBINS R.C.: "Parieral eye nerve in the fence lizard". Science, 1959. 130: 1573-1574.
- 32.- EDINGER, L.: "Untersuchungen Über die vergleichende Anatomie des Gehirns und Studien Über das Zwischenhirn del Reptilien". Abh. Senckenberg naturforsch. Ges., 20, H, 2, 161-197, 1899.
- 33.- EVANS E.M.: "On the visual ultrastructure of the synaptic region of visual photoreceptors in cetain vertebrates". Z. Zellforsch. 71; 499-615, 1966.
- 34.- FAIVRE E.: "Etudies sur le conarium et les plexus choroides chez l'homme et les animaux". Ann. Sc. nat. s. 4. Zool. 7, 1857.
- 35.- FISKE, V.M. "Effect of light on the weight of the pineal in the rat". Endocrinology 66, 489-491 (1960).
BRYANT, G.K.y
PUTMAN, J.:

- 36.- GONZALEZ, G. "Ultraestructura de la glándula pineal
ALVAREZ-URIA, M. de los mamíferos. I. Imágenes sinápti
FERNANDEZ, B.: cas en los pineocitos". Trab. del Inst.
Cajal de Inv. Biol. Vol. 61, Páginas
41-62, 1969.
- 37.- GONZALEZ, G., "Modificaciones en la ultraestructura
ALVAREZ-URIA, M. de la glándula pineal resultantes de
PEYDRO, A. y la oftalmoenucleación bilateral".
RODRIGO, J.: Bol. R. Soc. Española Hist. Nat. (Biol.)
67, 193-197 (1969).
- 39.- GONZALEZ, G. y "Ultrastructural Evidence of a Secre
BLAZQUEZ, E.: tory Process in the Rat Pineal Gland".
Experientia 31, 969, (1975).
- 40.- GUSEK, W. y "Elektronenoptische Beobachtungen zur
SANTORO, A.: Ultramorphologie der Pinealzellen bei
der Ratte". Biol. Latina, 13: 451-464
1960.
- 41.- GUSEK, W. y "Zur Ultrastruktur der Epiphysis ce-
SANTORO, A.: rebri der Ratte". Endokrinologie, 41:
105, 129, 1961.
- 42.- GUSEK, W. y "Weitere Untersuchungen zur Feinstruk
BUSS, H. and tur der Epiphysis cerebri normaler und
WARTENBERG, H.: vorbehandelter Ratten". Progr. Brain.
Res, 10, 317-331, 1965.

- 43.- HAGEMANN.: "Über den Bau des Conariums". Archiv. Anat. Physion. u Wissenschaft. Medizin, 1872.
- 44.- HALARIS, A., "Effect of benzoquinolizine (R04-1284)
RUTAER, E. y on granulated vesicles of the rat --
MATUSSEK, N.: brain". Z. Zellforsch., 76: 100-101,
1967.
- 45.- HASSLER, R. y "Effects of amine-depleting and amine-
BAK, I.J. : storing substances in the axon terminals of the pineal gland". In: 5th.
int. Congr. Electron Microscopy Kyoto
1966-521, 522. Tokyo: Maruzen co.1966.
- 46.- HENDRICKSON, A.E. "An autoradiographic and electron microscopic study of retino-hypothalamic connetions". Z. Zellforsch., 135,
WAGONER, N. y 1-26 (1972).
COWAN, W.M.:
- 47.- HENLE: "Handbuch der Anatomie des Menschen".
Nervenlebre. Tome III (1871).
- 48.- HENLE, F.G.J.: "Handbuch der systematischen Anatomie
des Menschen". Nervenlehre pag. 322,
1887.

- 49.- HOLMGREN, N.: "Zum Bau der Epiphyse von *Squalus acanthias*". Arkiv. Zool. 11, 1-28, (1918).
- 50.- HOLMGREN, N.: "Zur Kenntnis der Parietalorgane von *Rana temporaria*". Arkiv. Zool. 11, 1-13 (1918).
- 51.- HOPSU, V.K. y ARSTILA, A.V.: "An aparent somato-somatic synaptic structure in the pineal gland of rat". Experimental research., vol. 37, 1965.
- 52.- HOPSU, V.K. y ARSTILA, A.V.: "Electron microscopic on the structure and histochemistry of the pineal gland of the rat". Neuroendocrinology. suppl. 2, 101, 1967.
- 53.- ILLNEVOV, A.W. "Effect of light on the serotonin - content of the pineal gland". Life Sci., 10: 955-961 (1971).
- 54.- ILLNEVOV, A.H. y SKOPOU, A.J.: "Regulation of the diurnal rhythm in rat pineal serotonin-N-acetyltransferase activity and serotonin content during ontogenesis". J. Neurochem. 26: 1051-1052 (1976).

- 55.- JOCHLE, W.: "Über die Wirkung eines Epiphysenextraktes (Glanepin) auf sexuelle Entwicklung und Sexualzyklus junger weiblicher Ratten unter normalen Haltungsbedingungen und bei Dauerbelichtung". Endokrinologie, 33, 287, 1956.
- 56.- KAPPERS, J.A.: "The development, topographical relations and innervations of the epiphysis cerebri in the albino rat". Z. Zellforsch. 32:163, 215, 1960.
- 57.- KAPPERS, J.A.: "The mammalian pineal organ". J. Neurosci. Rel. Suppl. IX, 40-184, 1969.
- 58.- KAPPERS, J.A.: "The pineal gland: an introduction.. In the pineal gland". A CIBA Foundation symposium G.E.W. Wolstenholme - and J. Knight (Eds), Churchill Livingstone, Edinburgh, pp 3-34, 1971a.
- 59.- KAPPERS, J.A.: "Innervation of the pineal organ: phylogenetic aspects and comparison of the neural control of the mammalian pineal with that of other neuroendocrine systems. In subcellular organization and function in Endocrine -

Tissues, H. Heller and K. Lederis -
(eds.), mem. Soc. Endocrinol; 19, 27
47, 1971b.

60.- KELLY DE.: "Pineal organs: Photoreception, secre-
tion and development". Am. Sci. 50:
597, 1962.

61.- KELLY DE.: "The pineal organ of the newt; a de-
velopmental study". Z. Zellforsch.
58:693-713, 1963.

62.- KENNY, G.C.T.: "The nervous conarii of the monkey
(an experimental study)". J. Neuro-
pathol. Exptl. Neurol., 20:563-571,
1961.

63.- KENNY, G.C.T.: "The innervation of the mammalian pi-
neal body (a comparative study)".
Proc. Australian Assoc. Neurol., 3:
113-140, 1965

64.- KRABBE.: "Sur la glande pinéale chez l'homme"
Nouvelle Iconographie de la Salpêtriè-
re, num. 4, 1911.

- 65.- KLEIN, D.C. y WELER,J.L.: "A rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity". Science. 177: 532-533 -- (1972).
- 66.- KLEIN, D.C.: "The pineal gland: a model of Neuro-endocrine regulation. The Hypothalamus, edited by S. Reichlin. R.J. Baldessatini, and J.B. Martin. Raven Press New York 303-327 (1978).
- 67.- KOLLIKER.: Cit. Cajal "Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés". II-486 (1972).
- 68.- KUWANO,D.S.: "Comparative studies on the innervation of the intracranial epiphysis in certain amphibians". Ph.D.Thesis, University of Colorado, Dissertation -- Abstr., 25, n° 449- 1-141, 1964.
- 69.- LE GROS CLARK, McKEOWN, T. y ZUCKERMAN,S.: "Visual pathways concerned gonadal - Stimulation in ferrets". Proc. Roy. B.m. 126:449-468, 1939.
- 70.- LE GROS CLARK,: "The nervous and vascular relations of the pineal gland". J. Anat. 74, - 471-492 (1939-1940).

- 71.- LE GROS CLARK,: "The nerve of the pineal gland". Na-
W.E. tura 145: pags. 349, 1940.
- 72.- LEONHARDT, H.: "Uber axonahnliche Fortsatze, Sekret-
bildung und Estrusion der hellen Pi-
nealozyten des Kaninchens". Z. Zell-
forsch. Mikroskop. Anat. 82, 307-320
(1967).
- 73.- LERNER, A.B. "Isolation of melatonin, the pineal
CASE, J.D., gland factor that lightens melanocy-
TAKAHASHI, Y-LEE tes". J. Am. chem. Soc. 80, 2587, -
T.H. y MORI 1958.
- 74.- MARIC, D.K., "Gonadotrophin content of pituitaries
MATSUYAMA, G.y of rats in constant strous induced by
LLOYD, C.W.: continuous illumination". Endocrinolo-
gy, 77: 529, 1965.
- 75.- MARSHALL, F.H.A.: "On the change over in the strous cy-
cle in animal after transference --
across the equator with further obser-
vation on the incident of breeding sea-
sons and the factor controlling sexual
periodicity". Proc. Roy. Soc. B., 413, 1937.



- 76.- MARSHALL, A.H.E. "An immine reaction in man against -
DAYAN, A.D.: seminomas dysgerminomas, pinealomas,
and the medistinal tumours of simi--
lar histological appearence". Lancet
II- 1102-1104, 1964.
- 77.- MEYNERT.: "Stricker's handbuch der Lehre von den
Geweber Leipzig 1871, cap. XXXI, von
Gehirne der Sangethiere.
- 78.- MILCOU, S.M.: (Com) and Postelnicou, D.L. L'influen
se de l'illumination prolongée sur la
structure de l'epiphyse chez covard".
Rev. Roumanine Endocrinol. 1, 175-
177, 1964.
- 79.- MILOFSKY, A.: "The fine atructure of the pineal in
the rat, with special reference to
parenchyma". Anatomical Record, vol.
127, 435, 1957.
- 80.- MOORE, R.Y., "Central control of the pineal gland;
HELLER, A., visual pathways". Arch. Neurol., 18:
BHATNAGER, R.K., 208-218, (1968)
WURTMAN, R.J. y
AXELROD, J.:

- 81.- MOORE, R., BHATNA "Central control of the pineal gland;
GAR, R.K., WURTMAN Visual pathways". Arch. Neurol 18 -
R.J., y AXELROD, J. 208- 218, 1968.
- 82.- MOORE, R.Y. y "A retinohypothalamic projection in
LENN, J.: the rat". J. Comp. Neurol., 146: 1-14
(1972).
- 83.- MOORE, R.Y.: "Retinohypothalamic projection in -
mammals: a comparative study". Brain
Res., 49: 403-409, (1973).
- 84.- OSKSCHE, A. y "Survey of the development and compa
cols. rative morphology of the pineal or-
gan". Program. Brain. Res. 10, 4, 1965.
- 85.- OSKSCHE, A. y "Elektronenmikroskopische Untersuchun
VAUPEL VON HAR- gen am stinorgan von Anurem (Zur Fra-
NACK, M.: ge der Lichtrezeptoren)". Z. Zell- -
forsch. Microscop. Anat. 59: 539-588
1963.
- 86.- OSKSCHE, A. y Elektronenmikroskopische Untersuchun
VAUPEL-VON gen an den Nervenbahnen des Pineal-
HARNACK, M. komplexes von Rana esculenta. L. Z.
Zellforsch. Mikroskop: Anat. 68, 389-
427, (1965).

- 87.- OKSCHE, A. y VAUPEL-VON HARNACK, M. "Electronenmikroskopische Untersuchungen an den Nervenbohlen des pineal komplexes von Rana esculenta". L.Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat. 68: 389-427, 1965.
- 88.- PALADE GEA.: "A study of fixation for electron microscopy". J. Exptl. Med., 285-345, 1952.
- 89.- PASTORI, G.: "Quelque osservazione sulla patogenesi delle clacificazione pineali". Pubblic. del Univ. Cat. Scienze biologiche, vol., IV, 1928.
- 90.- PELLEGRINO DE IRALDI, A. y DE ROBERTIS, E. "Action of reserpine on the submicroscopic morphology of the pineal gland". Experientia 17, 122-123, 1961.
- 91.- PELLEGRINO DE IRALDI, A., ZIEHER, L.M. y DE ROBERTIS, : "Ultrastructures and pharmacological studies of nerve endings in the pineal organ". Progr. Brain Res. 10, 389-422, 1965.
- 92.- PINES, L. "Über die Innervation der Epiphyse". Neurol Psy, 111:357-369, 1925

- 93.- PROP, N.: "Lipids in the pineal body". Prog. Brain Res. 10, 454-464, 1965.
- 94.- QUAY, W.B. "Volumetric and cytologic variation in the pineal body of *Peromyscus leucopus* (Rodentia with respect to sex, captivity and body-length. J. Morphol, 98, 471-495, 1956.
- 95.- QUAY, W.B.: "Cytologic and metabolic parameters of pineal inhibition by continuous light in the rat, *Rattus norvegicus*, Z. Zellforsch, 60, 479-490, 1963.
- 96.- REITER, R.J. y FRASCHINI, F.: "Endocrine aspects of the mammalian pineal gland". Neuroendocrinology, 5, 219-255 (1969).
- 97.- REITER, R.J., SORRENTINO, S., JARROW, E.L.: "Central and peripheral neural pathways necessary for pineal function in the adult female rat". Neuroendocrinology, 8, 321-333 (1971).
- 98.- RHODIN, J.: "Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney". Thesis, Karolinska Instituted

Stockholm. Aktieklaget, Godnil, 1954.

- 99.- RODIN, A.E. y TURNER, R.A.: "The relationship of intravesicular granules to the innervation of the pineal gland". Lab. Inv. 14: 1644-1651-, 1965.
- 100.- RODIN, A.E. y TURNER, R.A.: "The perivascular space of the pineal gland". Texas Rep. Biol. Med. 24, 153-163, 1966.
- 101.- RODRIGUEZ PEREZ: "Contribución al conocimiento de la innervación de las glándulas endocrinas. IV primeros resultados experimentales en torno a la innervación de la epífisis". Trab. Inst. Cajal, Inv. Biol., 54: 1-8, 1962.
- 102.- RODRIGUEZ PEREZ: "Inervación de la epífisis a la luz de los nuevos recursos técnicos ultraestructurales del todo epifisario". En propiedad del C.S.I.C., Madrid, (sin publicar) 1964.
- 103.- RODRIGUEZ PEREZ: "Contribución al conocimiento de la innervación de las glándulas endocrinas. II. Contribución al conocimiento de la innervación de la epífisis -

con el método al osmio-yoduro de zinc".
Trab. Inst. Cajal inv. Biol., 54:1-8
1963.

104.- ROLLAG, M.D. y NISWENDER, G.D.: "Radioimmunoassay of serum concentrations of melatonin in sheep exposed to different lighting regimens". Endocrinology. 98: 482-488 (1976).

105.- ROTH, W.D., WURTMAN, R.J. y ALTSCHULE, M.D.: "Morphologic changes in the pineal - parenchyma cells of rats exposed to continuous light or darkness". Endocrinology, 71: 888, 1962

106.- ROWAN, W.C.: "Reaction of light and bird migration and developmental changes". Nature 115, 491-495, 1925.

107.- RUDEBERG, G.: "Structure of the pineal organ of the sardine, *sardina pilohardus*, *sardina* (Birso) and some further remarks on the pineal organ of *Mugil spp*". Z. - Zellforsch, Mikroskop. Anat. 84: 219-237, 1968.

108.- SANO Y MASHING, T.: "Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Epiphysis cerebri beim -

Hund". Z. Zellforsch. 69: 129-139.
1966.

109.- SAPER, C.B. LOE- "Direct hypothalamo autonomic connec-
WY, A.D., SWANSON tions". Brain Res. 117: 305-312, --
L.D. y COWAN.: (1976).

110.- SJOSTRAND, F.S.: "Ultrastructure of retinal rods synap-
ses of the guinea eye as revealed by
the dimensional reconstructions from
serial sections". J. Ultrastruct.
Res. 2:122-170, 1958.

111.- SMITH, C.A. y "Synaptic struture in the hair cells
SJOSTRAND, F.S.: of the guinea pig cochlea". J. Ultra-
struct. Res. 5: 184-192, 1961.

112.- SNYDER, S.H. y "Circadian rhythm in pineal seroto-
AXELROD, J.: nin. Effect of monoamine oxidase in-
hibition and reserpine". Science, 149:
542-544. 1965.

113.- SWANSON, L.W. y "The efferent connections of the su-
COWAN, W.M.: prachiasmatic nucleus of the hypotha-
lamus". J. Comp. Neurol., 160: 1-12,
(1975).

- 114.- SZENTAGOTHAJ, J. "Hypothalamic control of the anterior FLERKO, B., MESS, pituitary". Akademia Kiado. Budapest. B. y HALASZ, B.: (1960).
- 115.- TAXI, J.: "Les connexions dans le système nerveux autonome". Masson. Ed. 1965.
- 116.- WARTENBERG, H.: "Elektronenmikroskopische untersuchungen an der Epiphysis cerebri del Katze". Anat. Anz. 115, 275-279 (1965).
- 117.- WARTENBERG, H.: "Electron microscopie studies on nerve and glia processes and their relations to cells and vessels of the mammalian pineal organ". Anat. Rec. 154-439, 1966.
- 118.- WARTENBERG, H.: "The mammalian pineal organ: Election microscopic studies on the fine structure of pialocytes glial cell and on the perivascular compartment". Z. Zellforsch. 86: 74-97, 1968.
- 119.- WARTENBERG, H. y GUSEK, W.: "Licht-und elektronenmikroskopische Beobachtungen Uber die Struktur der Epiphysis cerebri des Kaninchens".

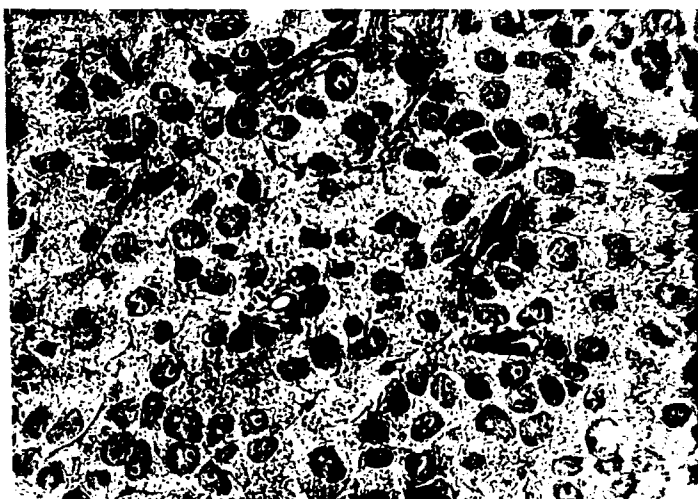
Prog. Brain. Res. 10: 296-315, 1965.

- 120.- WEIGERT.: "Beitrag zur Kenntnis normalen menschlichen Neuroglia". Frankfurt, 1895.
- 121.- WEISSBACH, H. "Biosynthesis of melatonin: Enzymic REDFIELD, B.G. y conversion of serotonin to N-acetylserotonin". Biochim. Biophys. Acta. AXELROD, J.: 43, 352-353 (1960).
- 122.- WILKINSON, M. "Determination of a dark-induced increase in pineal N-acetyltransferase ARENDT, J. y DE activy and simultaneous radioimmunoassay of melatonin in pineal, serum, and pituitary tissue of the male rat". ZIEGLER, D.: J. Endocrinol., 72:243-244 (1977).
- 123.- WOLFE, D.E.: "The epiphysical cell an electron microscopic study of its intercellular relationship an intracellular morphology in the pineal body of the albino rat". Prog. in Brain. Res., 10: 332-388, 1965.
- 124.- WOLFE, D.E., PO- "Localizing treated norepinephrine in TTER, L.T., RI- sympathetic axonx by electron micros-

- CHARDSON, K.C. y copic autoradiography". Science, 138:
AXELROD, J.: 440-442, 1962.
- 125.- WURTMAN, R.J. "Demostration of hydroxyindole-o-me-
AXELROD, J. y thyltransferase, melatonin and sero-
TOCH, R.: tonin in a metastatic parenchimatous
inealoma". Nature, 204: 1323-1324,
1964.
- 126.- WURTMAN, R.J., "Inhibition of the metabolism content
AXELROD, J. and in the rat pineal and submaxillary -
ANTON-TAY, F.: glands". Cife Sci., 115-161, 1968.
- 127.- WURTMAN, R.J., "Formation of melatonin and 5-hydro-
LARIN, F., AXEL- xyindole acetic from ¹⁴c-tryptophan
ROD, J., SHEIM, H. by rat pineal glands in organ cultu-
M., ROSASCO, K.: re". Nature, 217, 953-954. 1968.
- 128.- WURTMAN, AXEL- "The pineal". Academic Press. New -
ROD y KELLY.: York and London (1968).
- 129.- YUWILLER, A., "Adrenergic control of pineal N-ace-
KLEIN, D.C. tyltransferase activity: Development
BUDA, M. y WE- aspects". Am. Physiol, Vol. 233 (3)
LLER, J.L. 141-146. (1977).

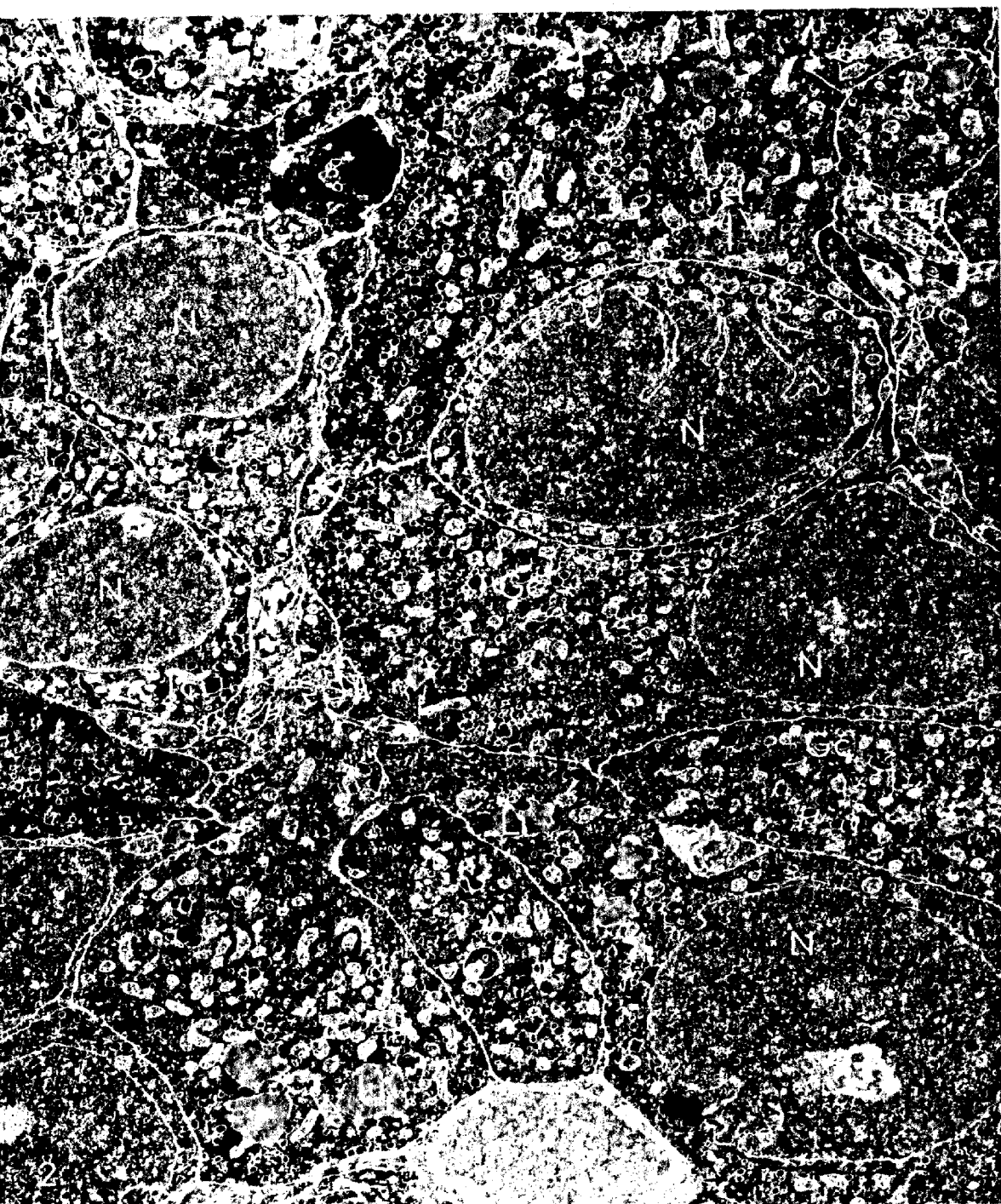
- 130.- ZWEENS, J.: "Influence of the cycle and ovariectomy on the phospholipid content of the pineal gland". Nature, 197: 114-115, 1963.

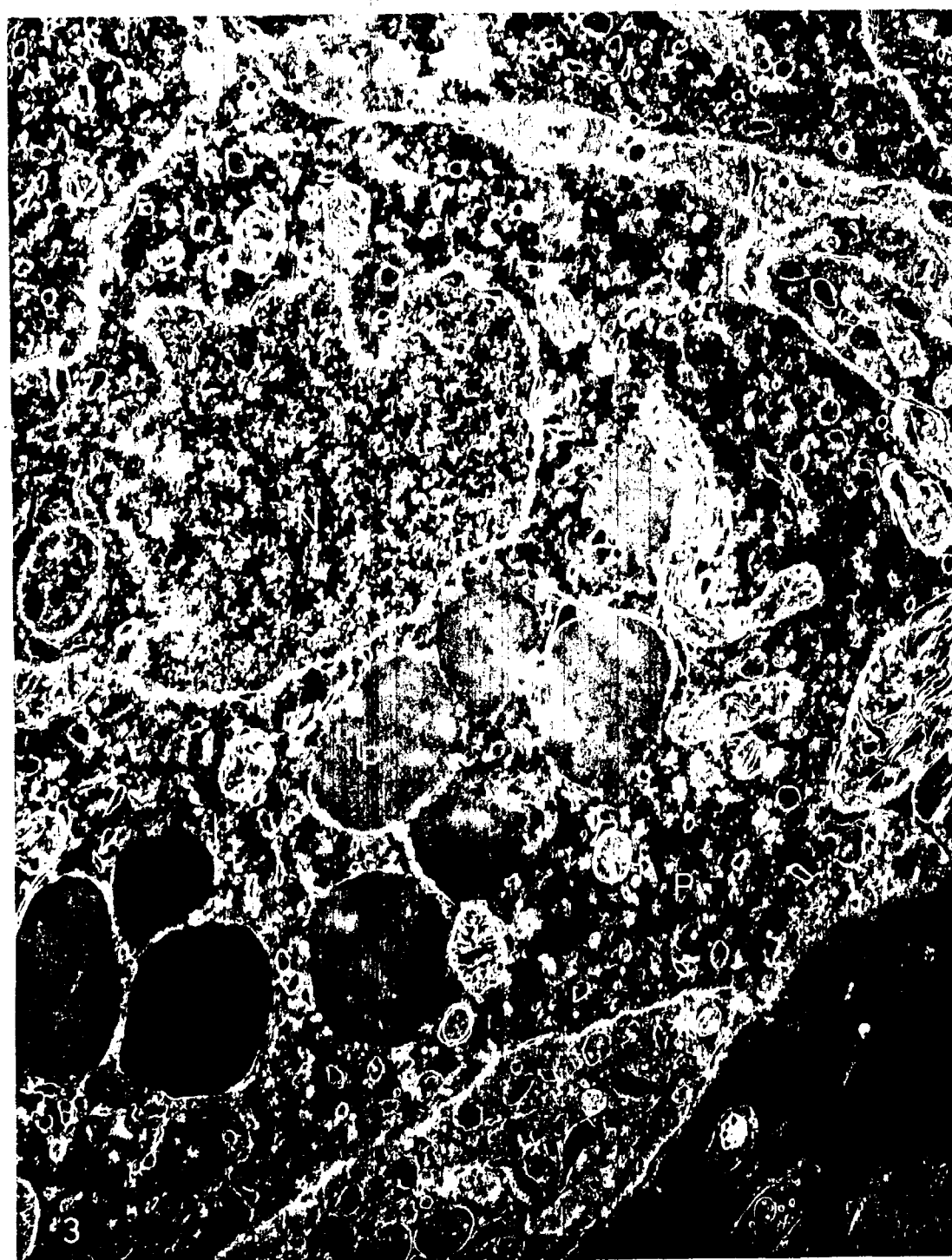
GRUPO Nº 1
RATAS CONTROLES.
Fig. 1 a fig. 18.

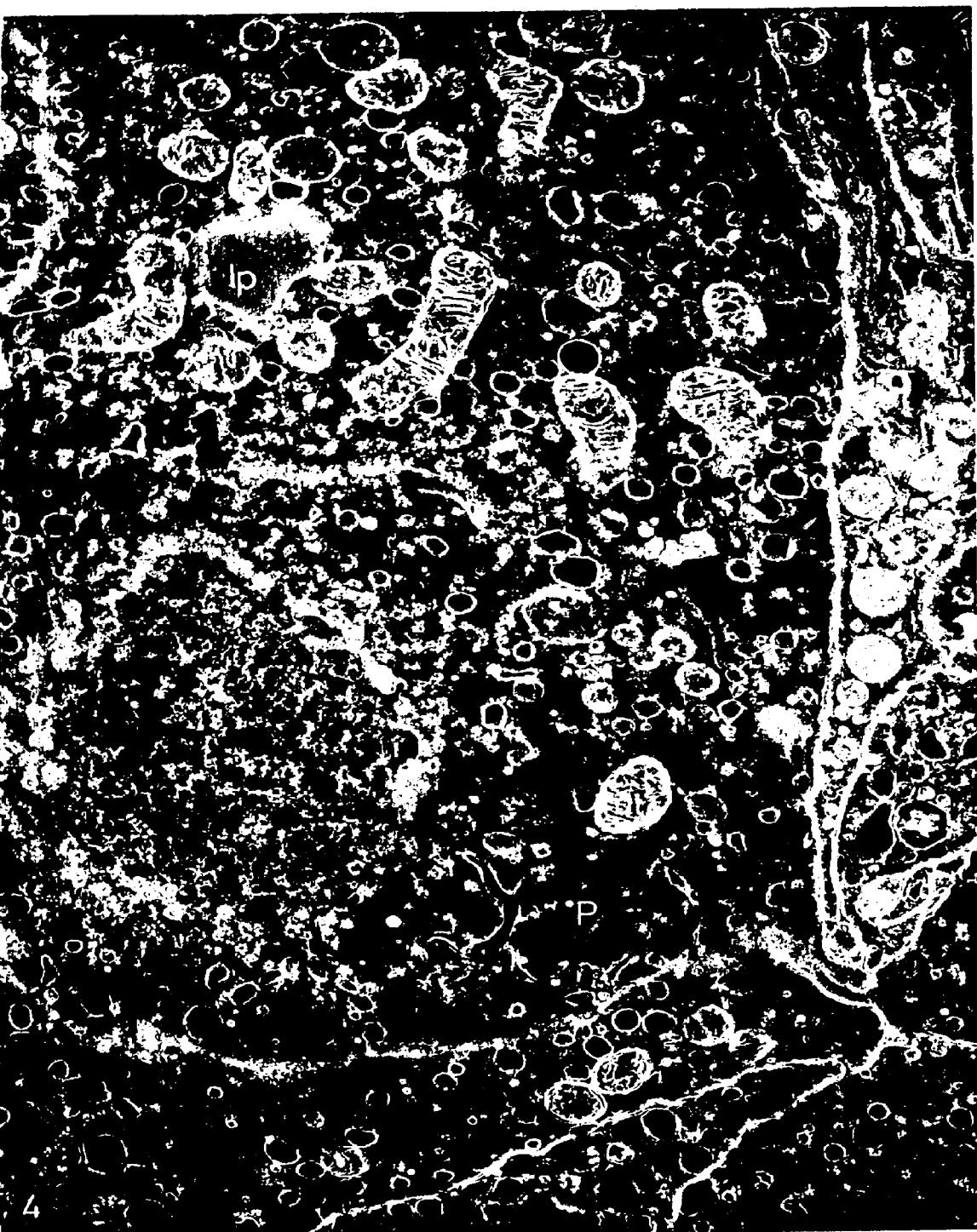


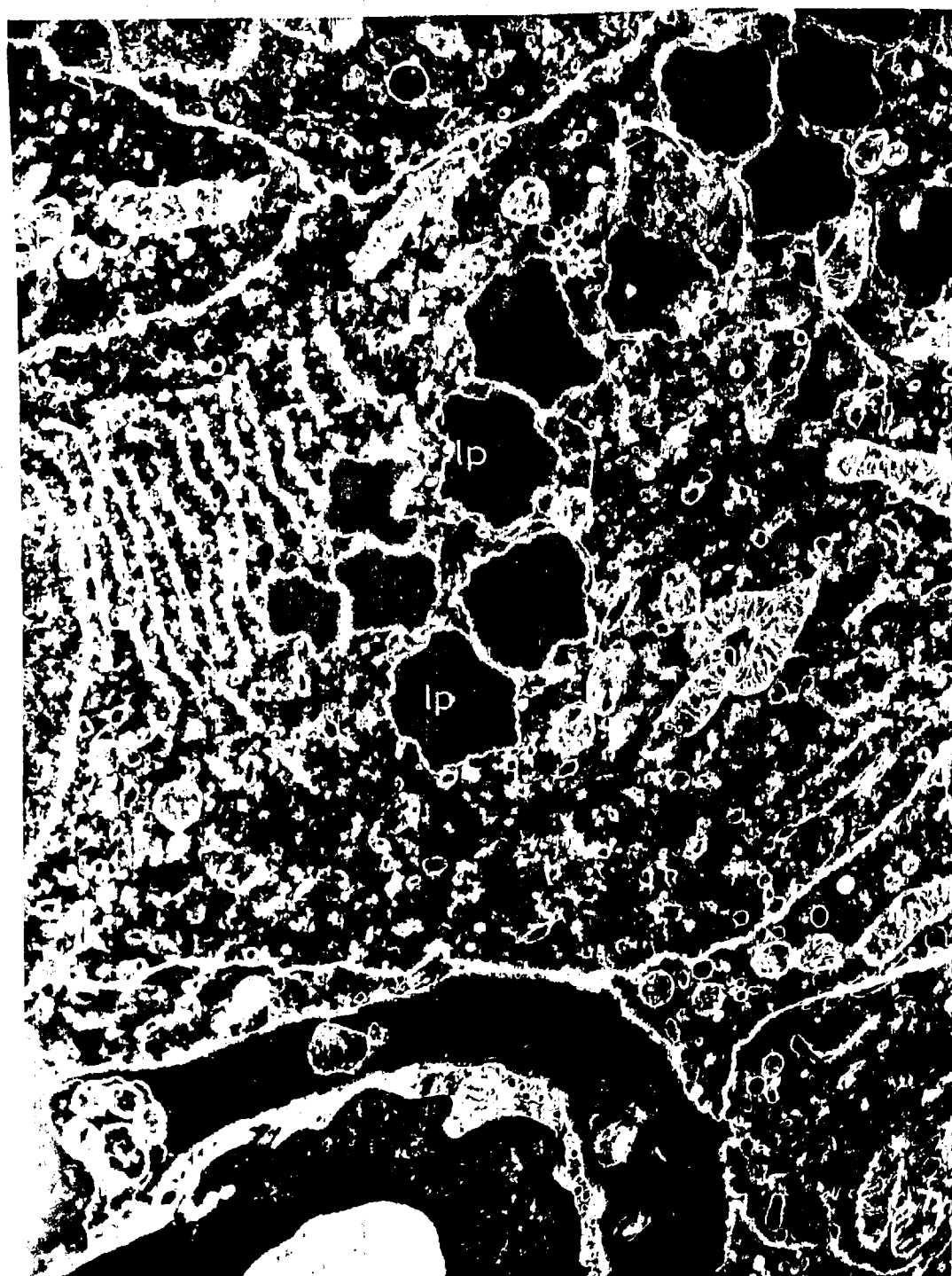
MUESTREO PARA MICROSCOPIA OPTICA DEL BLOQUE DE P.F.,
TENIDO CON AZUL DE TOLUIDINA.

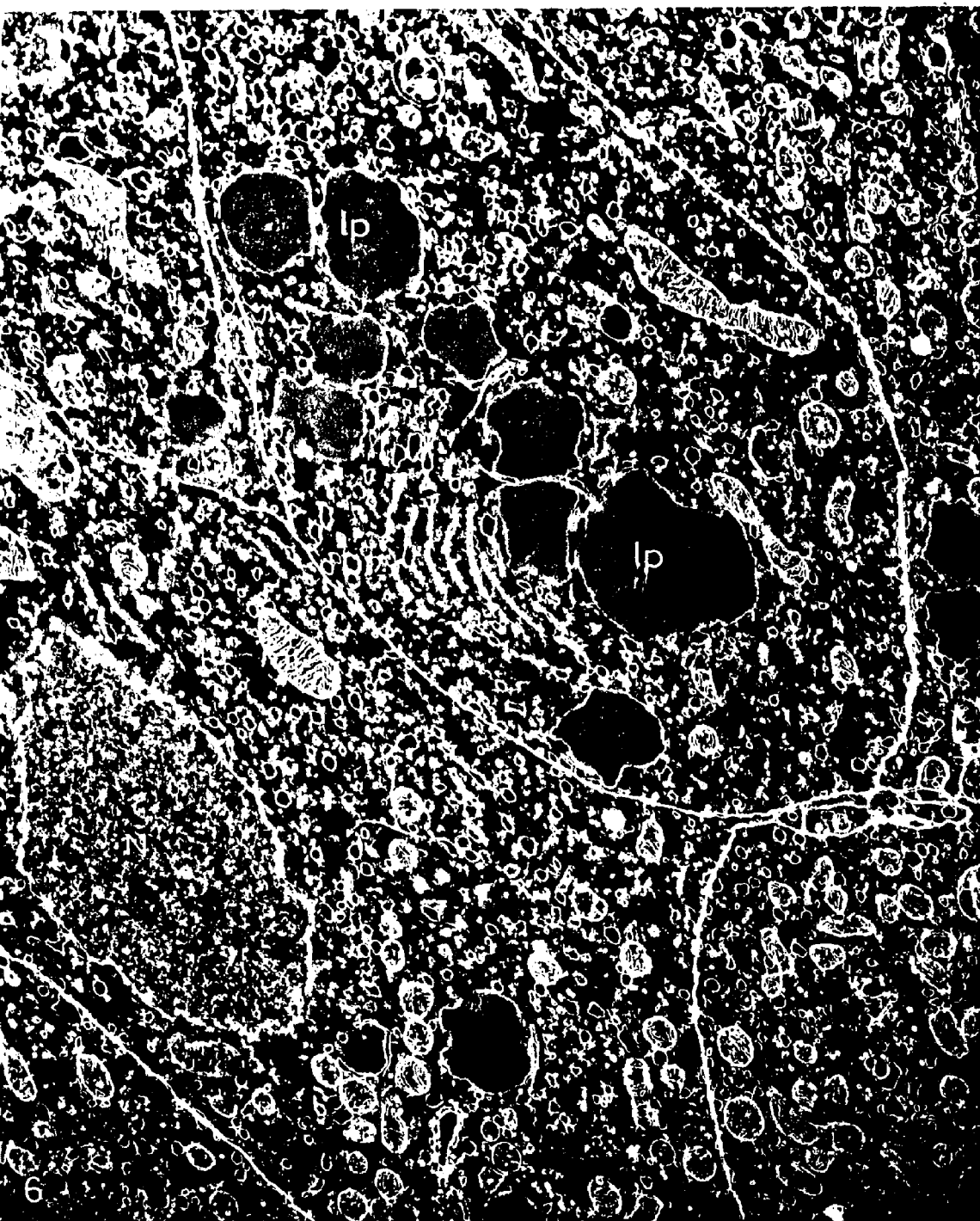




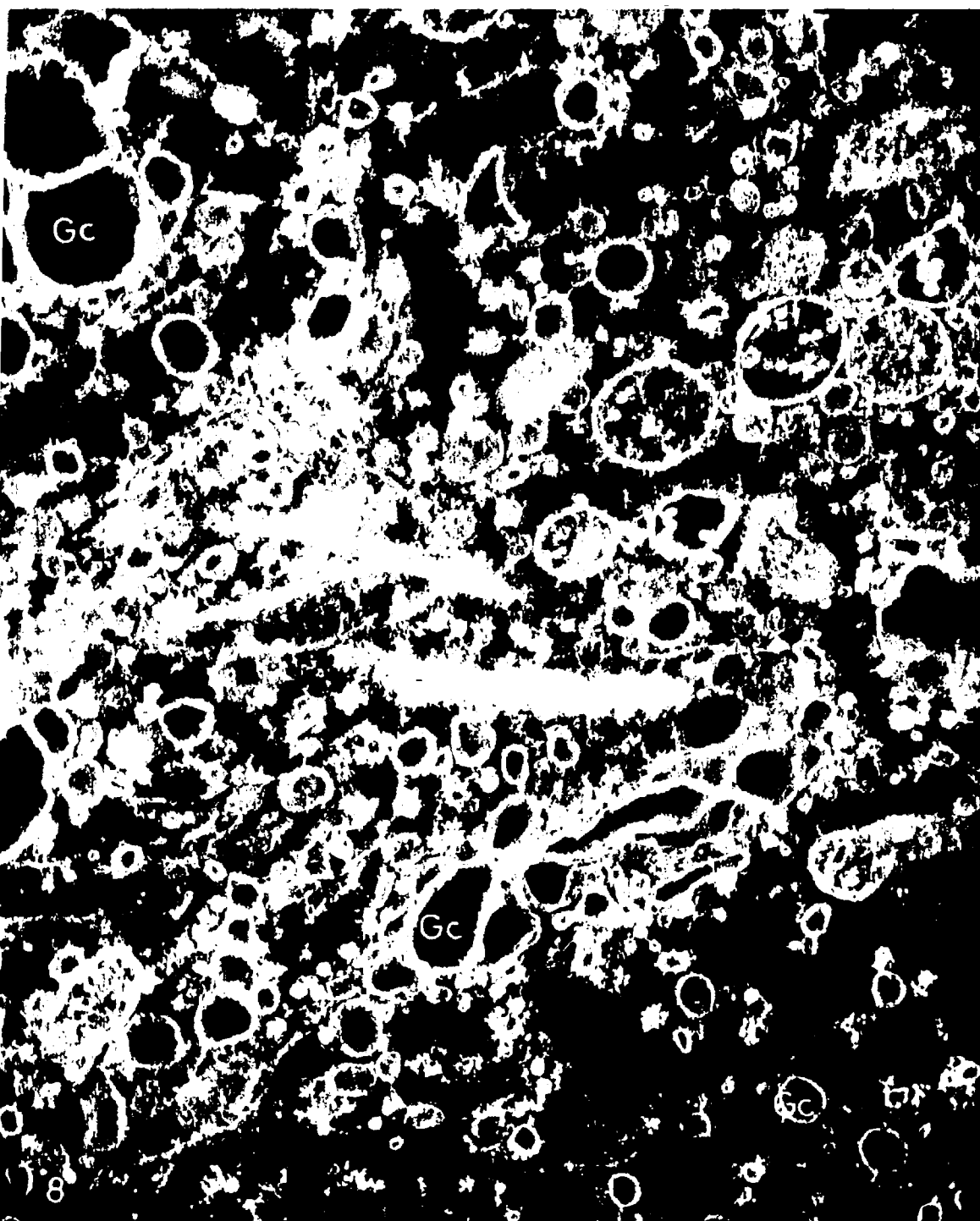




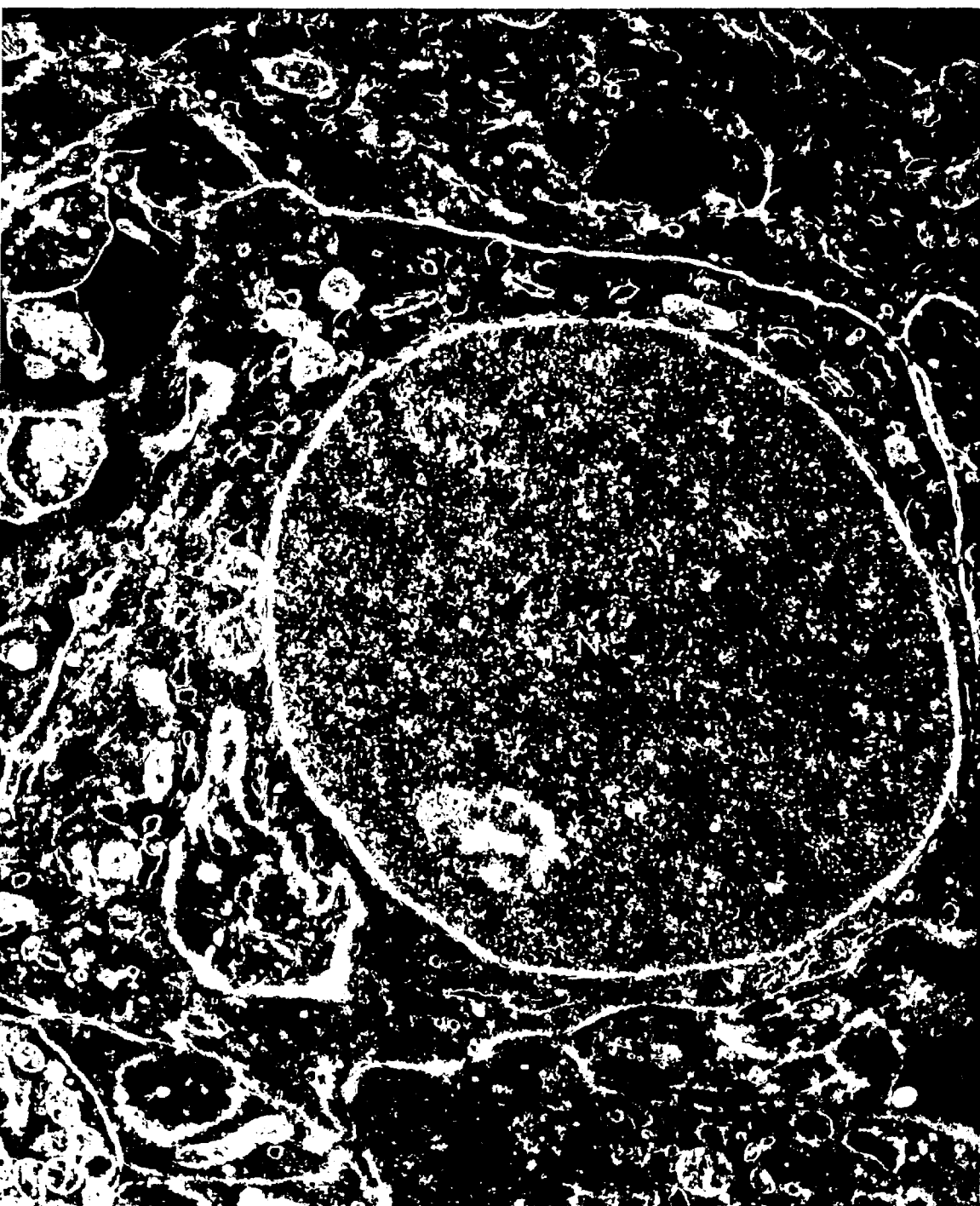












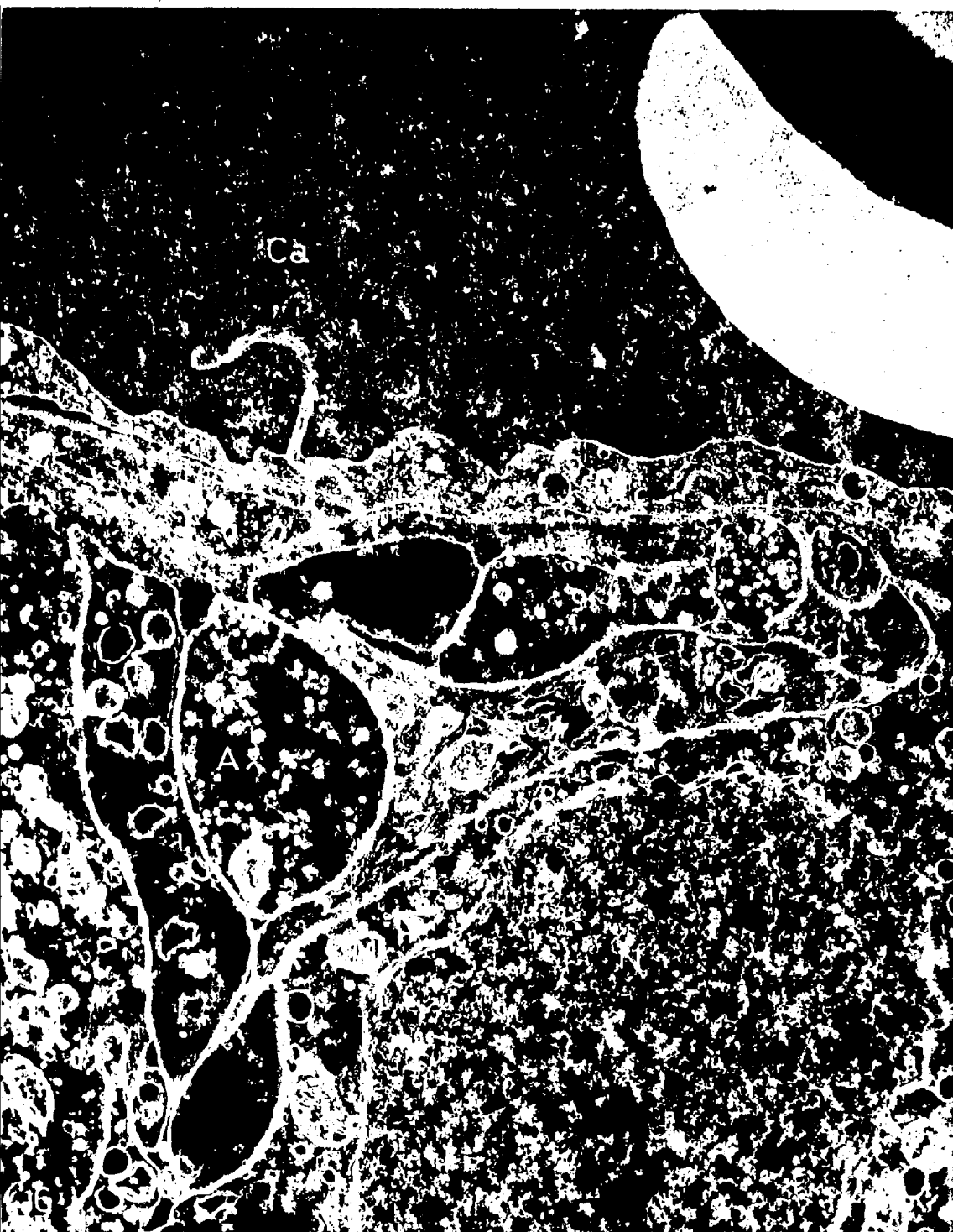








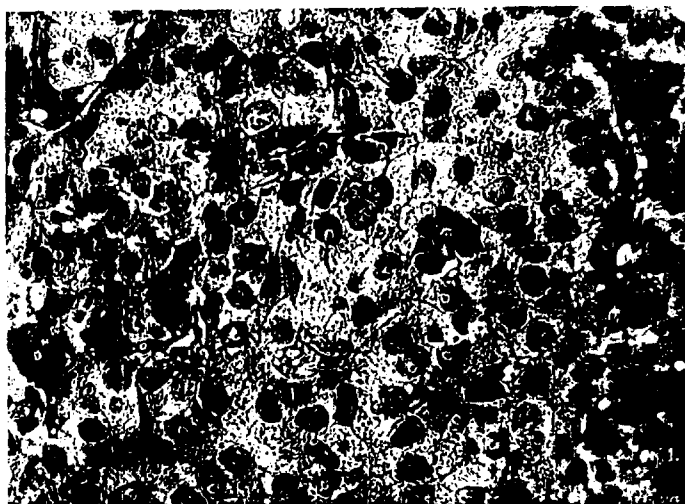




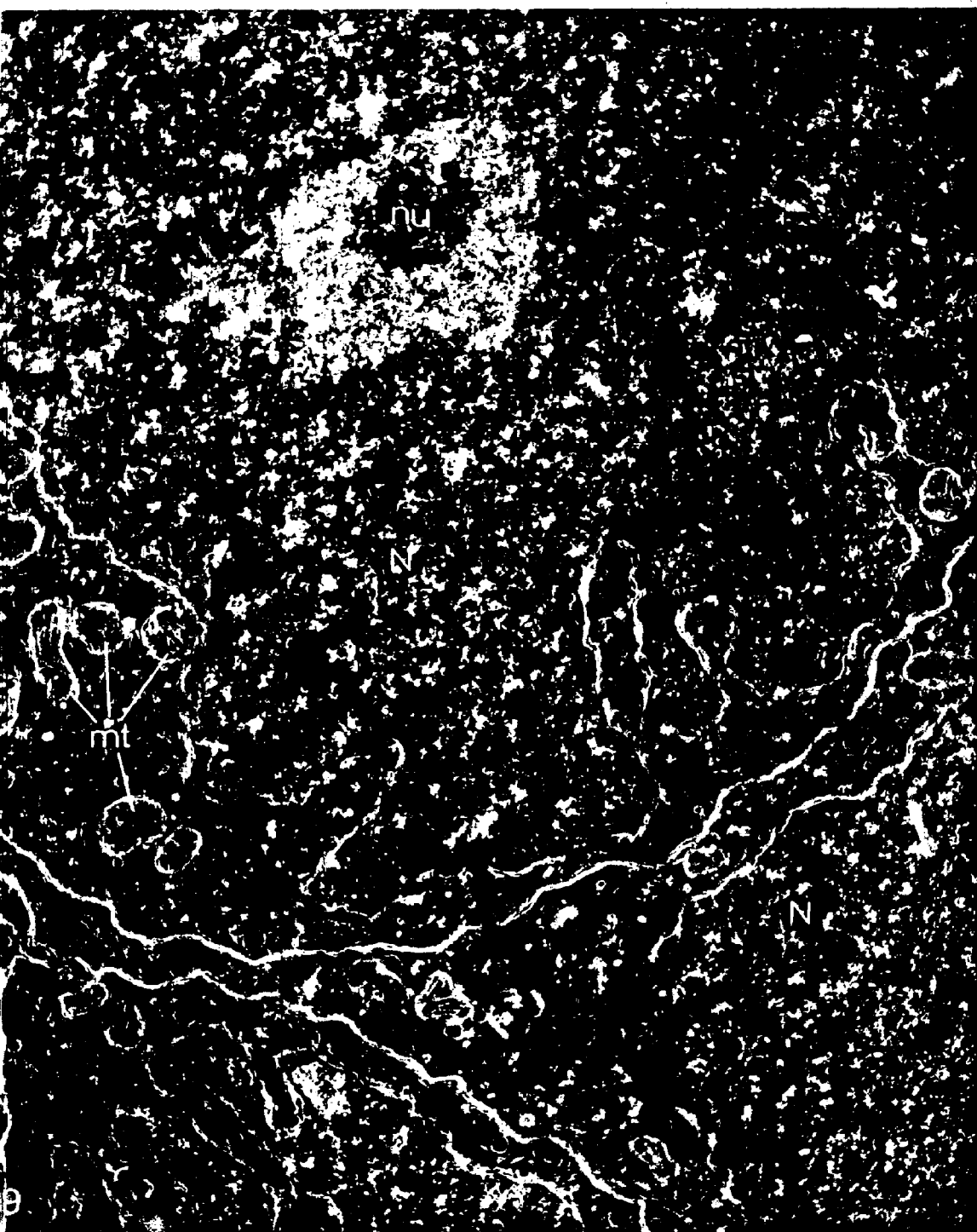


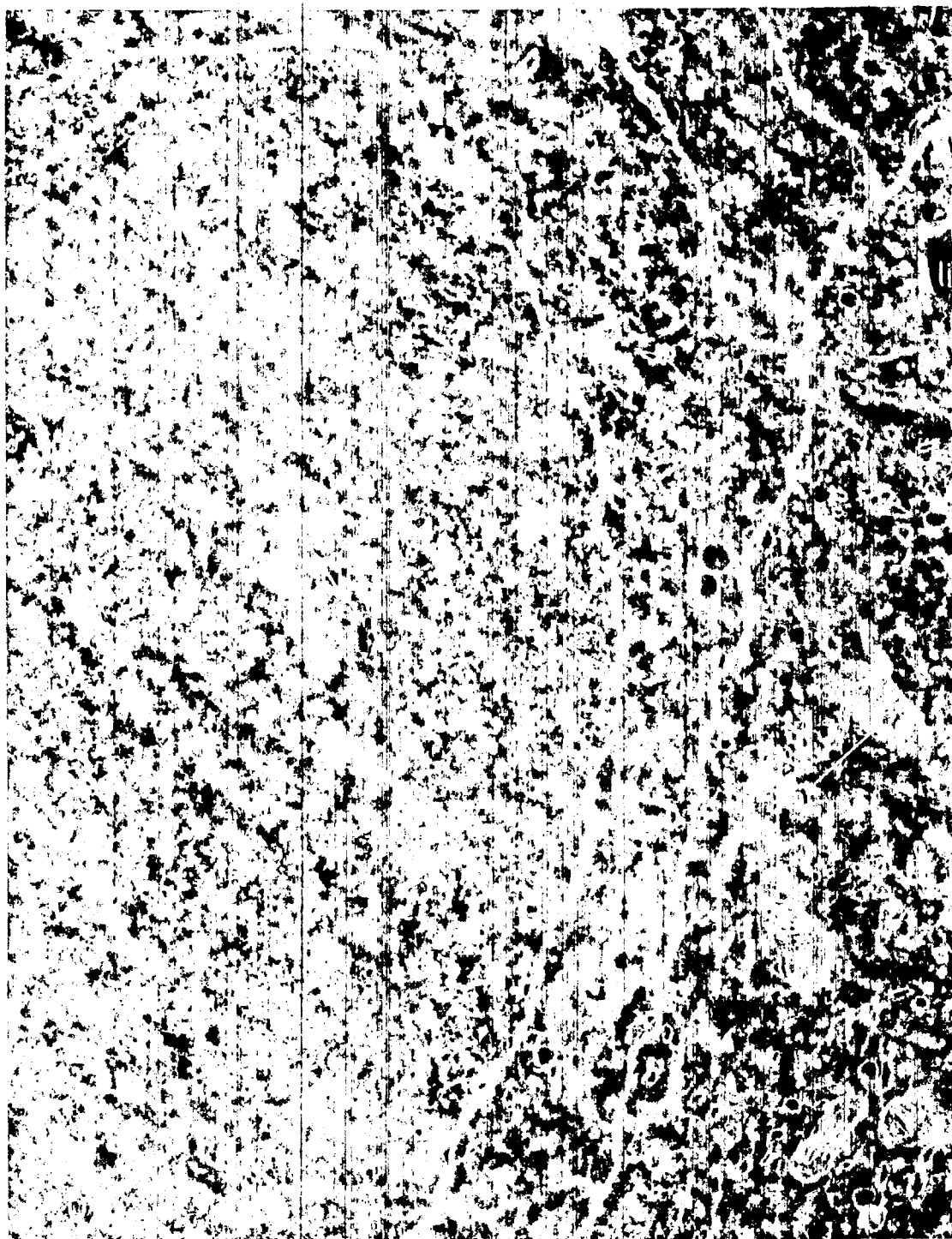


GRUPO Nº 2
RATAS EXPERIMENTALES
GANGLIECTOMIZADAS
Fig. 19 a fig. 24.

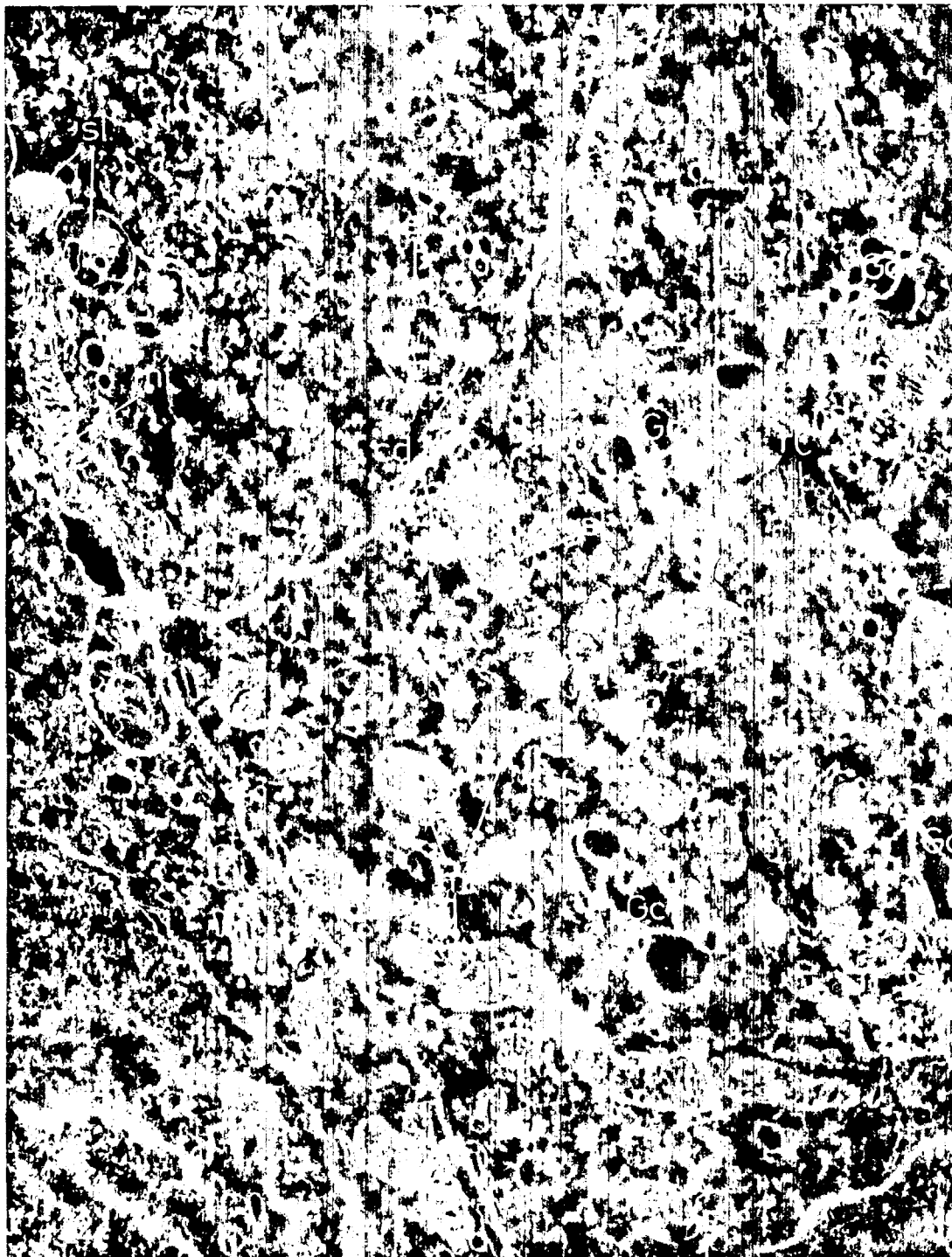


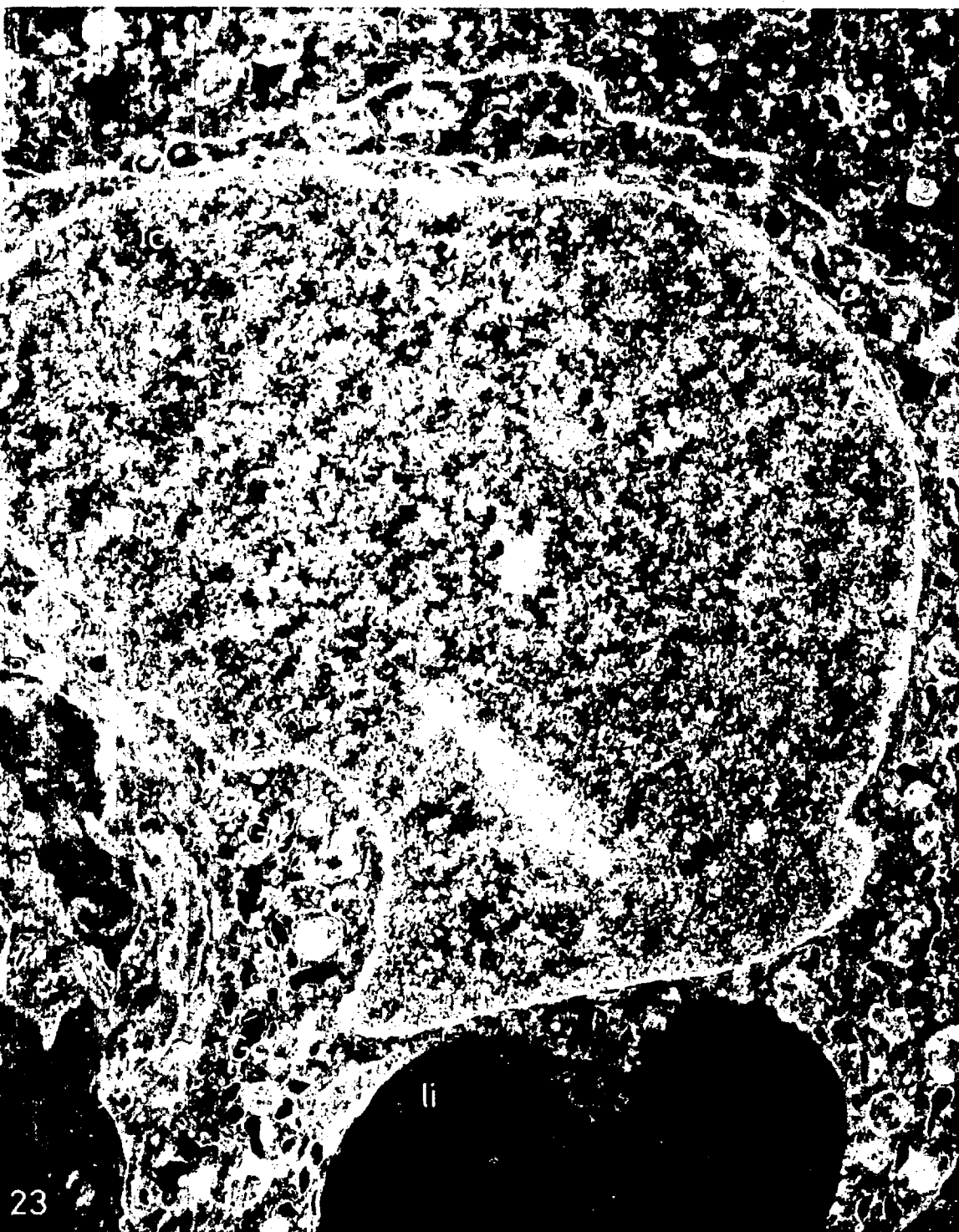
MUESTRO PARA MICROSCOPIA OPTICA DEL BLOQUE DE M.E.,
TEÑIDO CON AZUL DE TOLUIDINA.

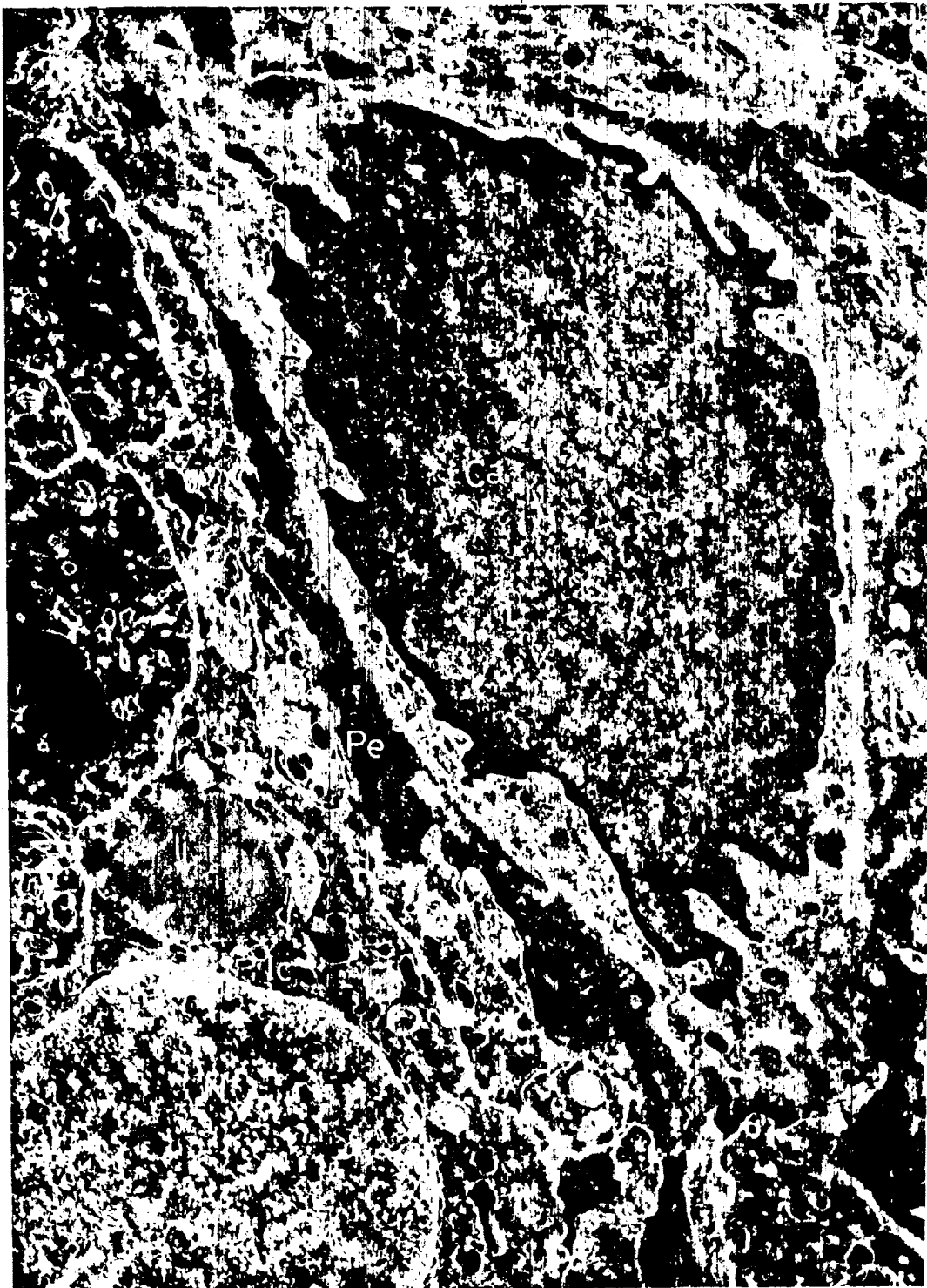




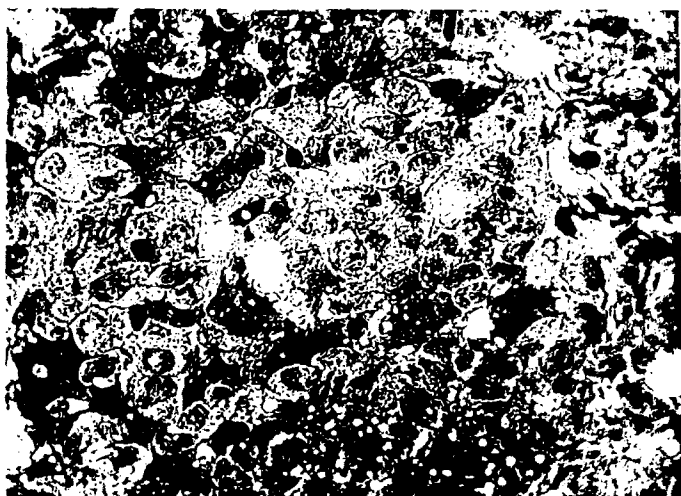






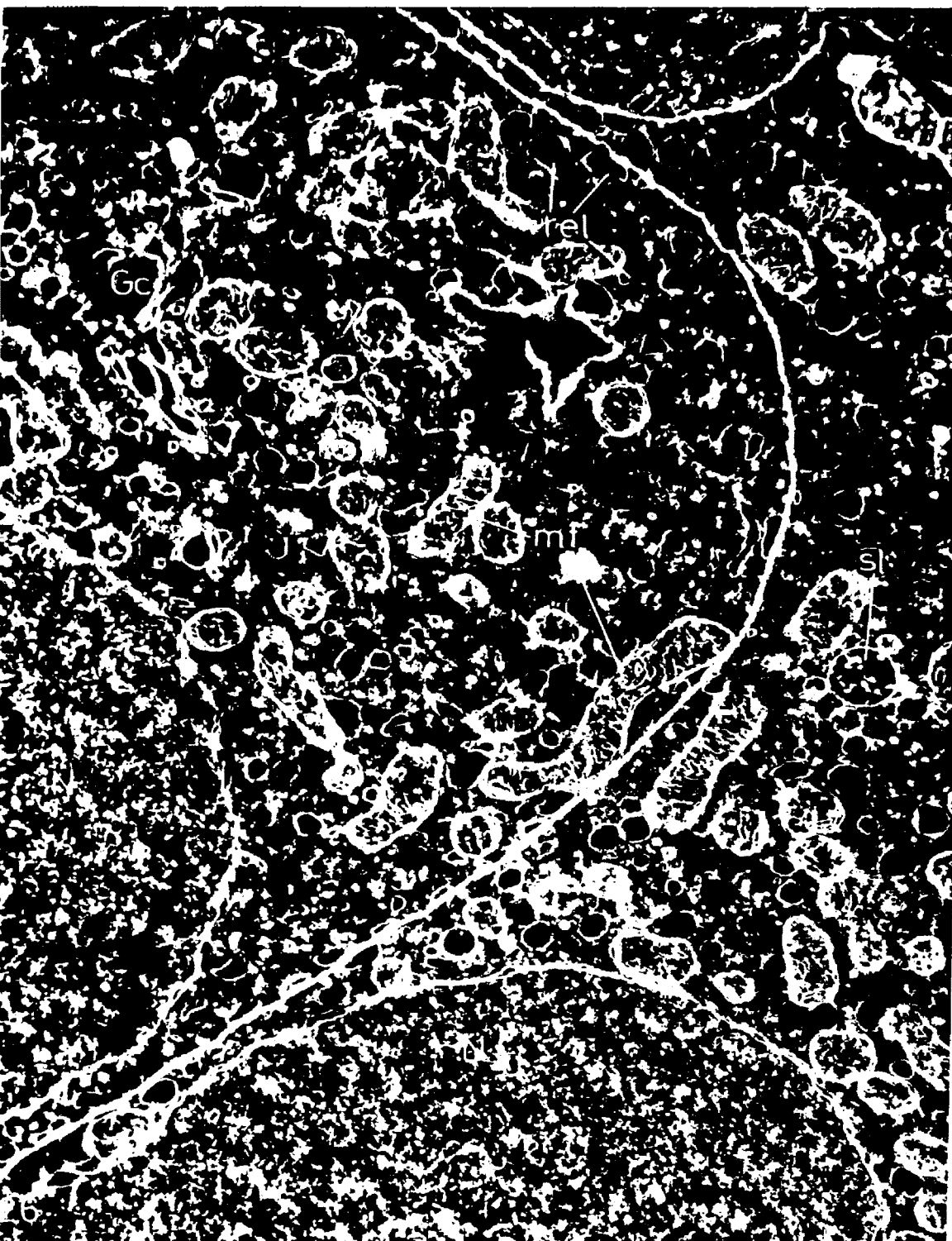


GRUPO Nº 3
RATAS EXPERIMENTALES
ULTRASONICO AGUDO.GANG.
Fig. 25 a fig. 41.

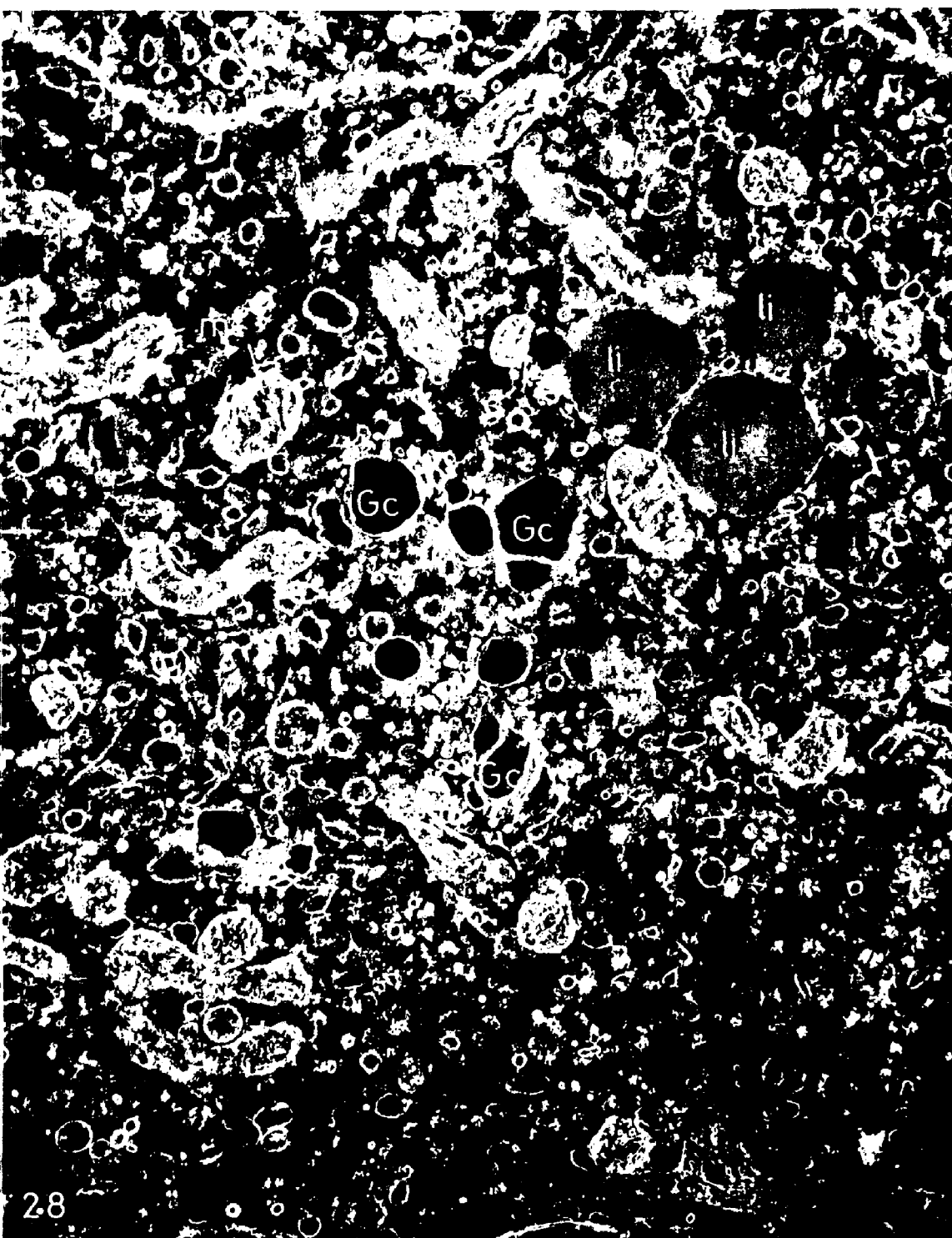


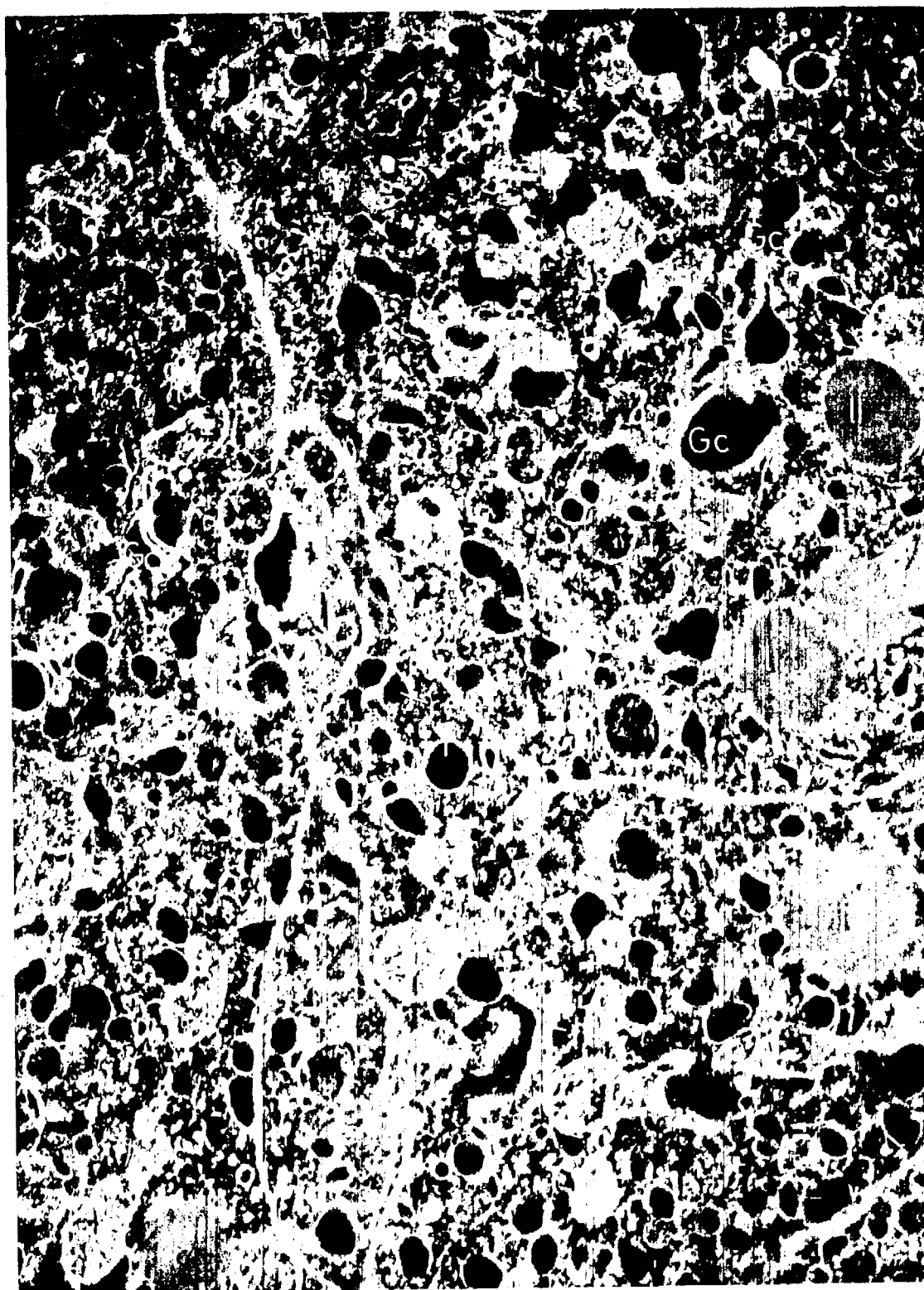
MUESTREO PARA MICROSCOPIA OPTICA DEL BLOQUE DE G.E.,
TEÑIDO CON AZUL DE TOLUIDINA.

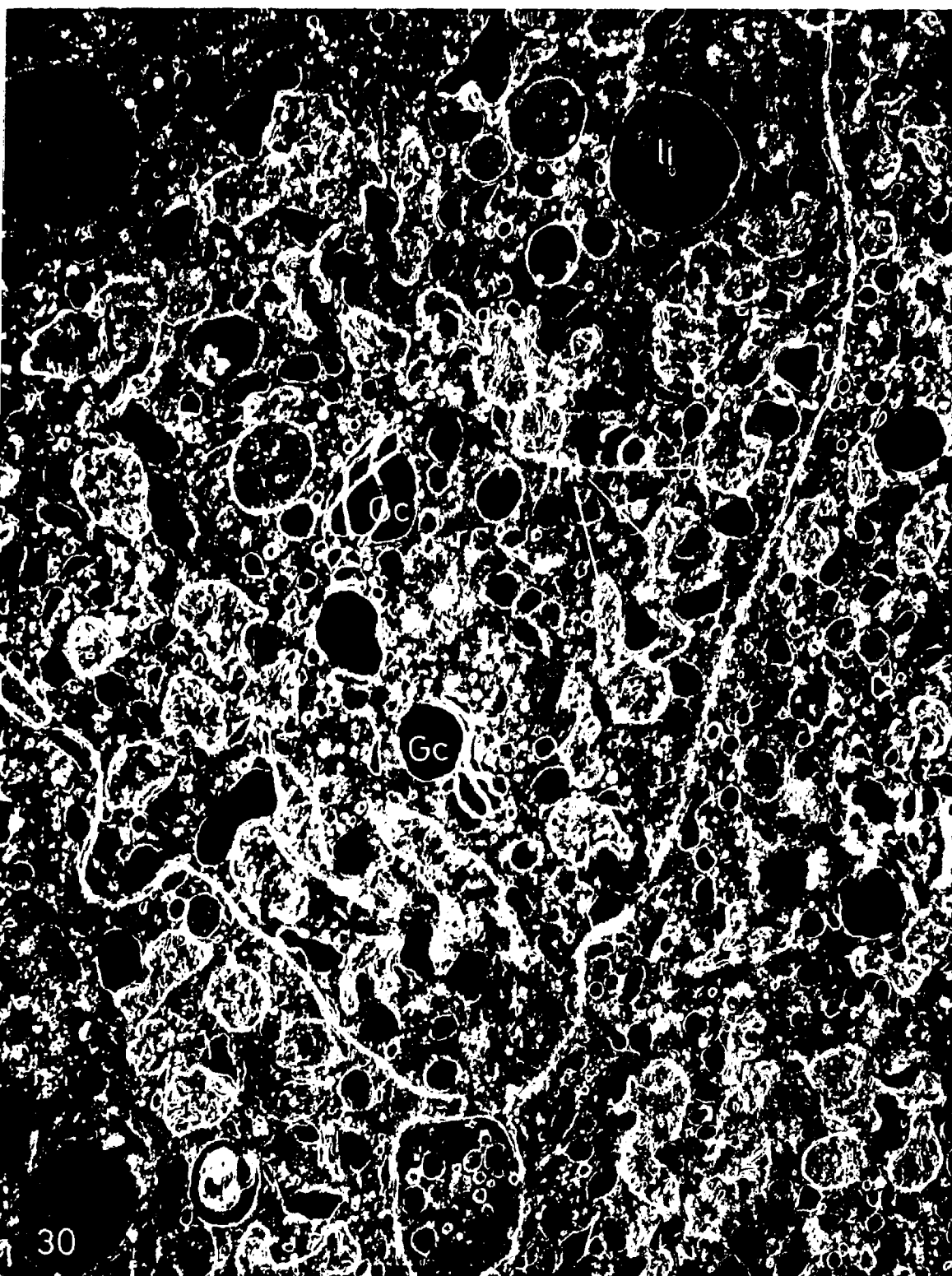


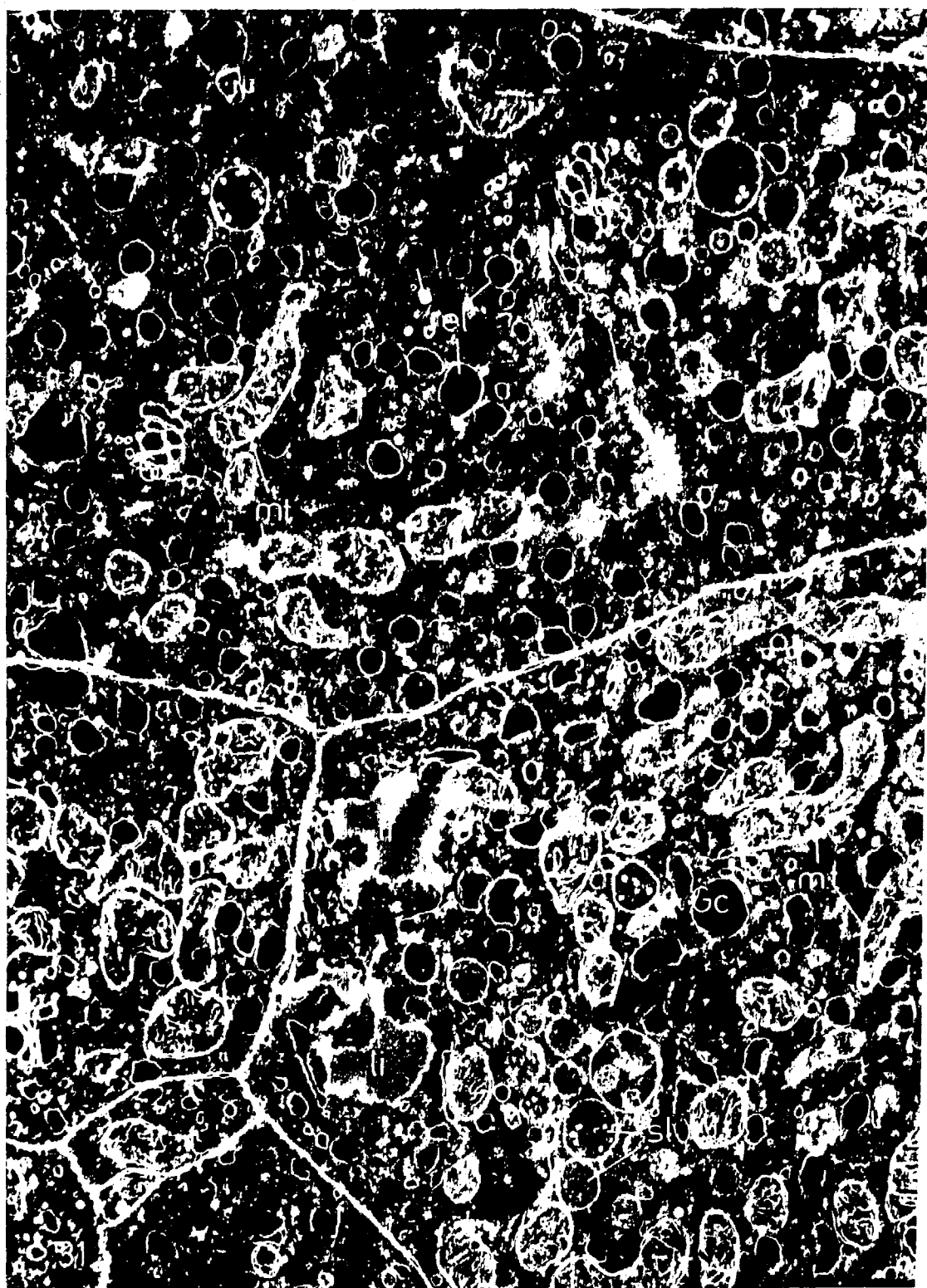


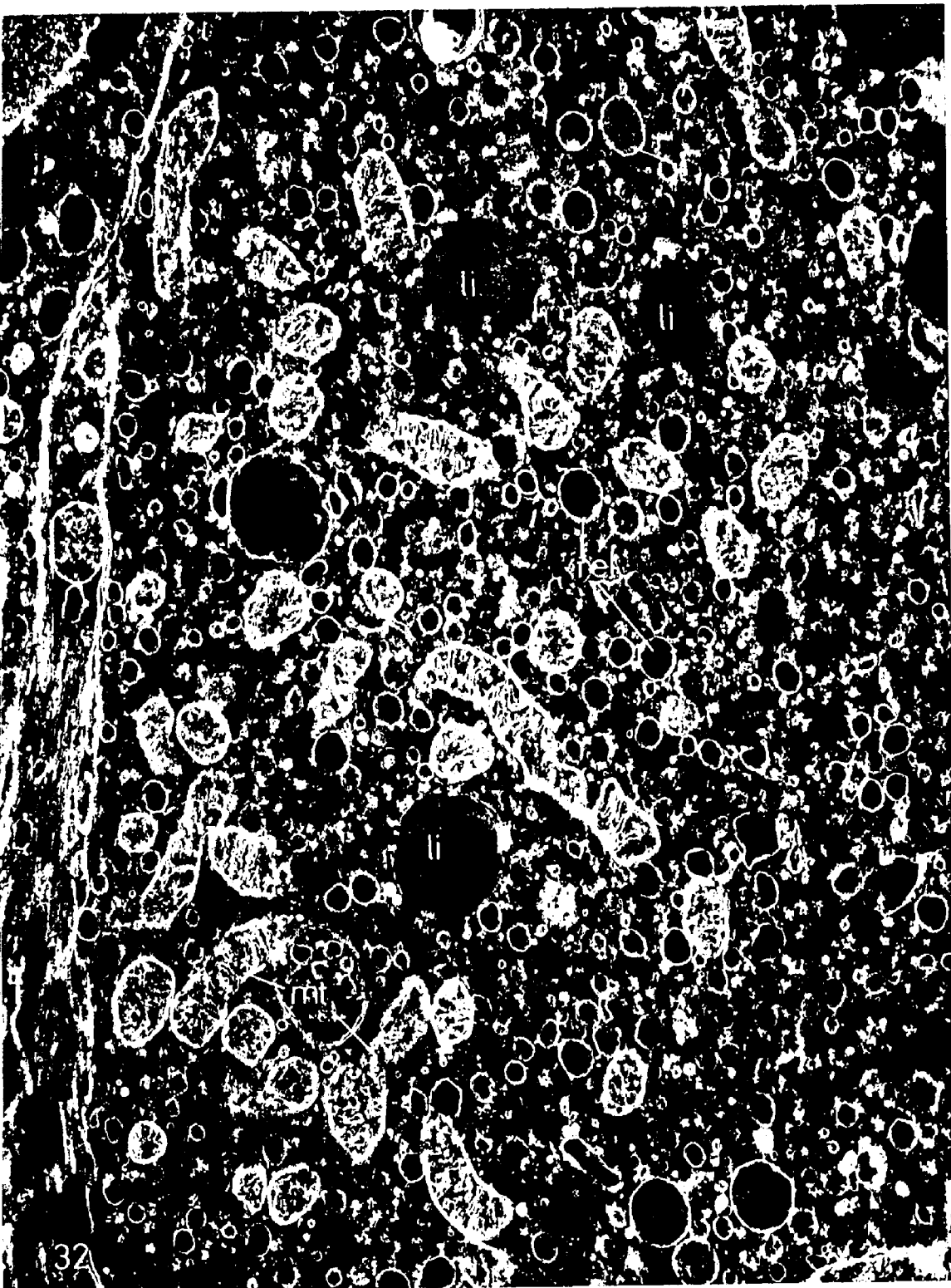


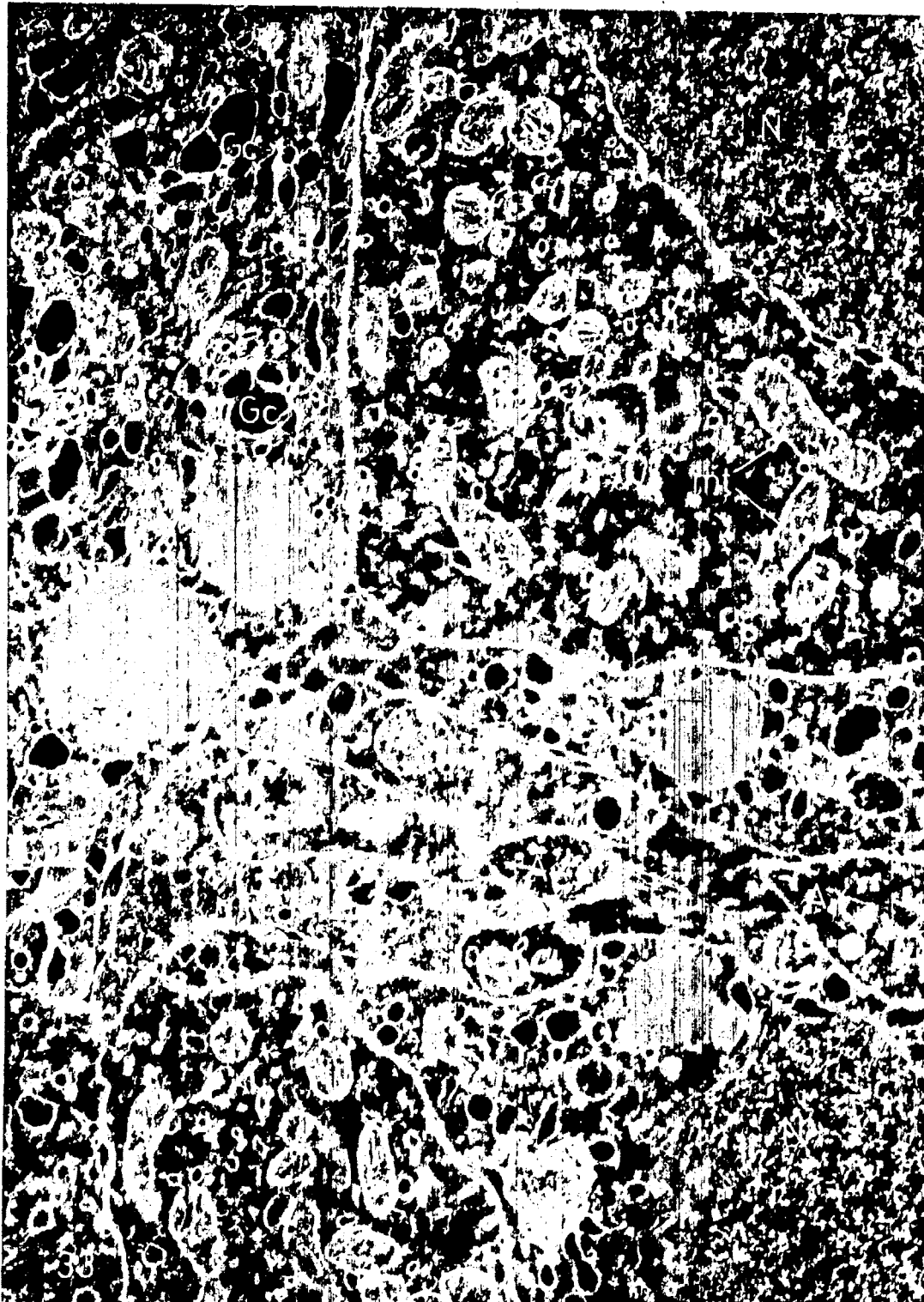


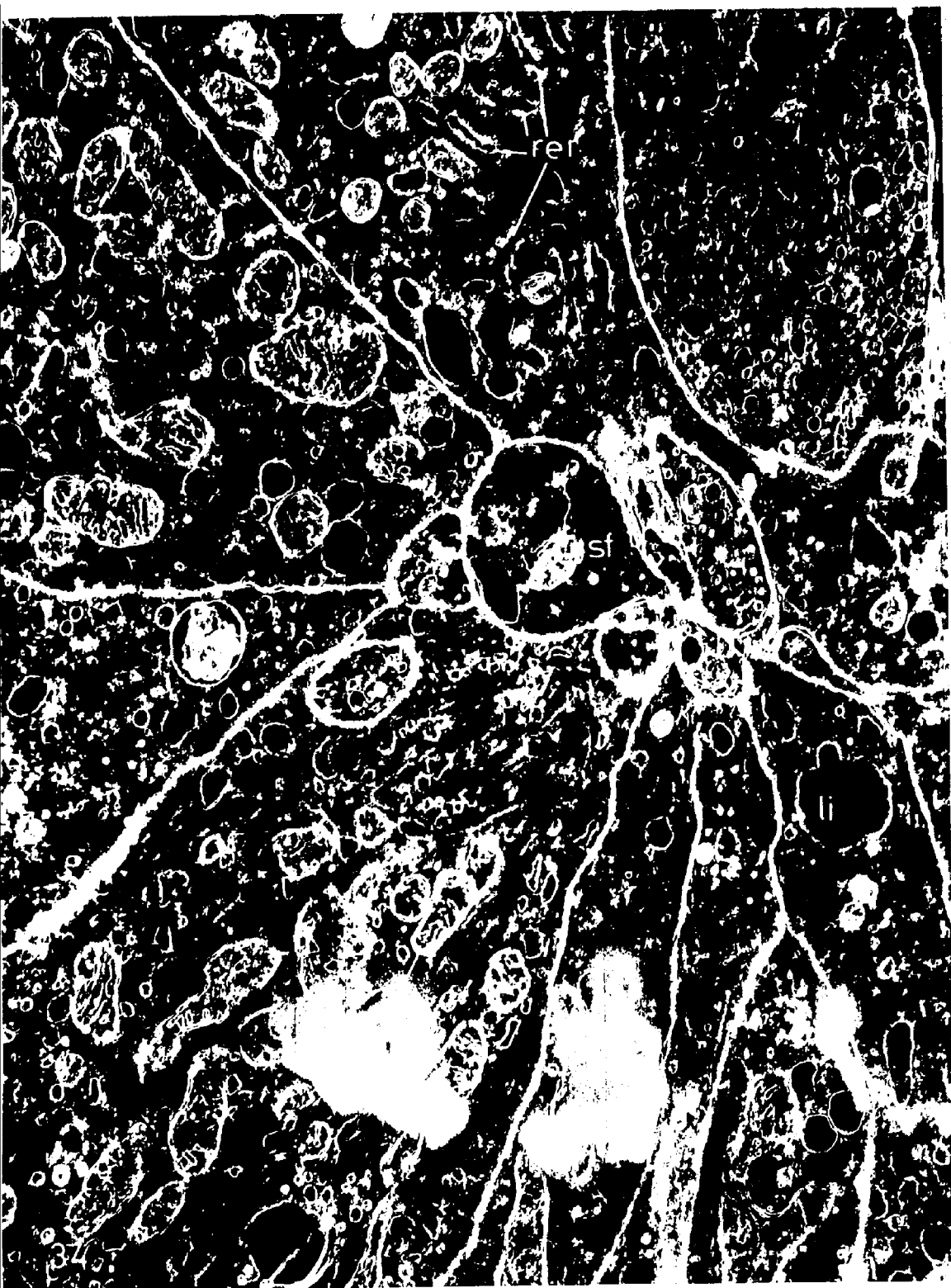


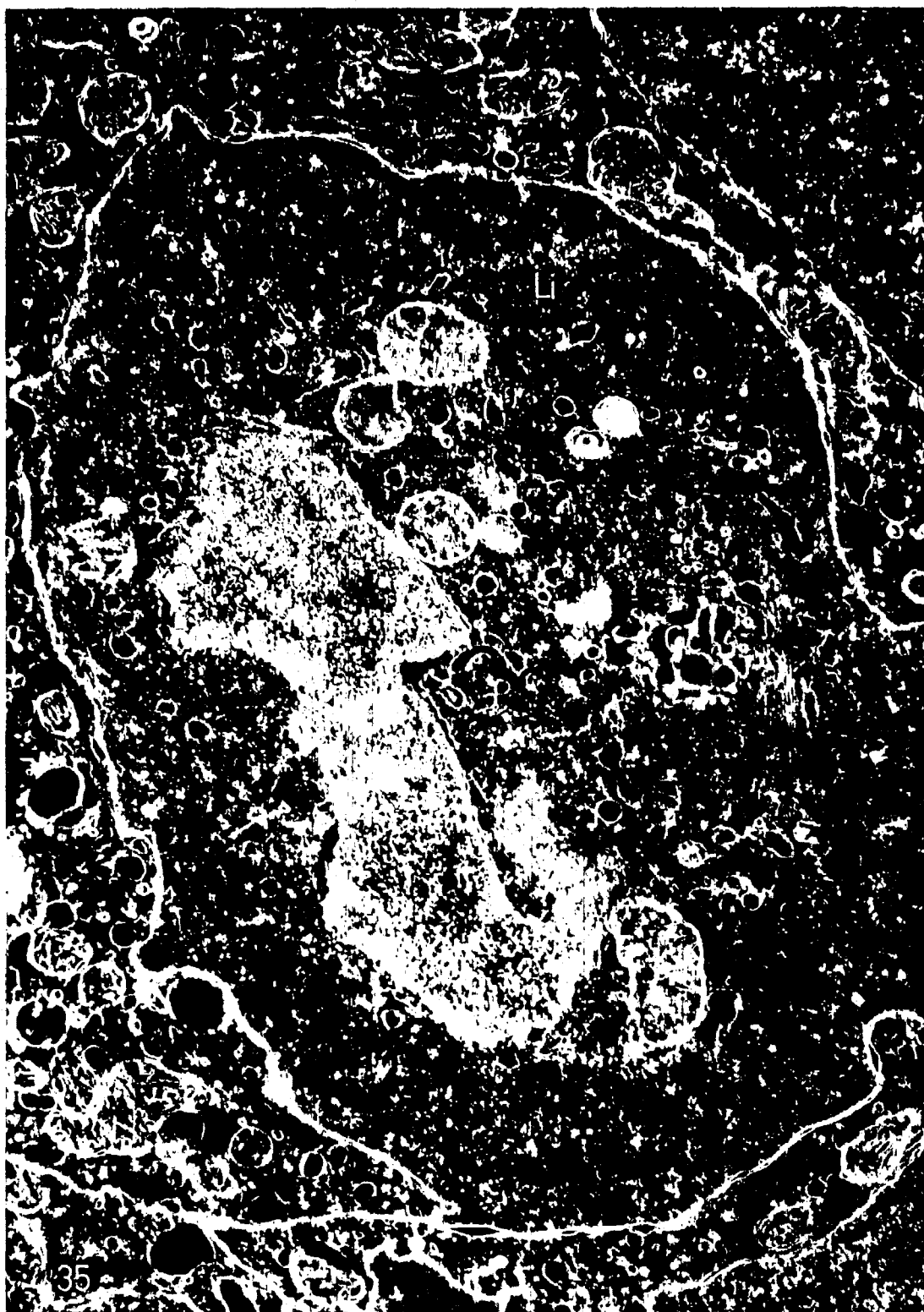


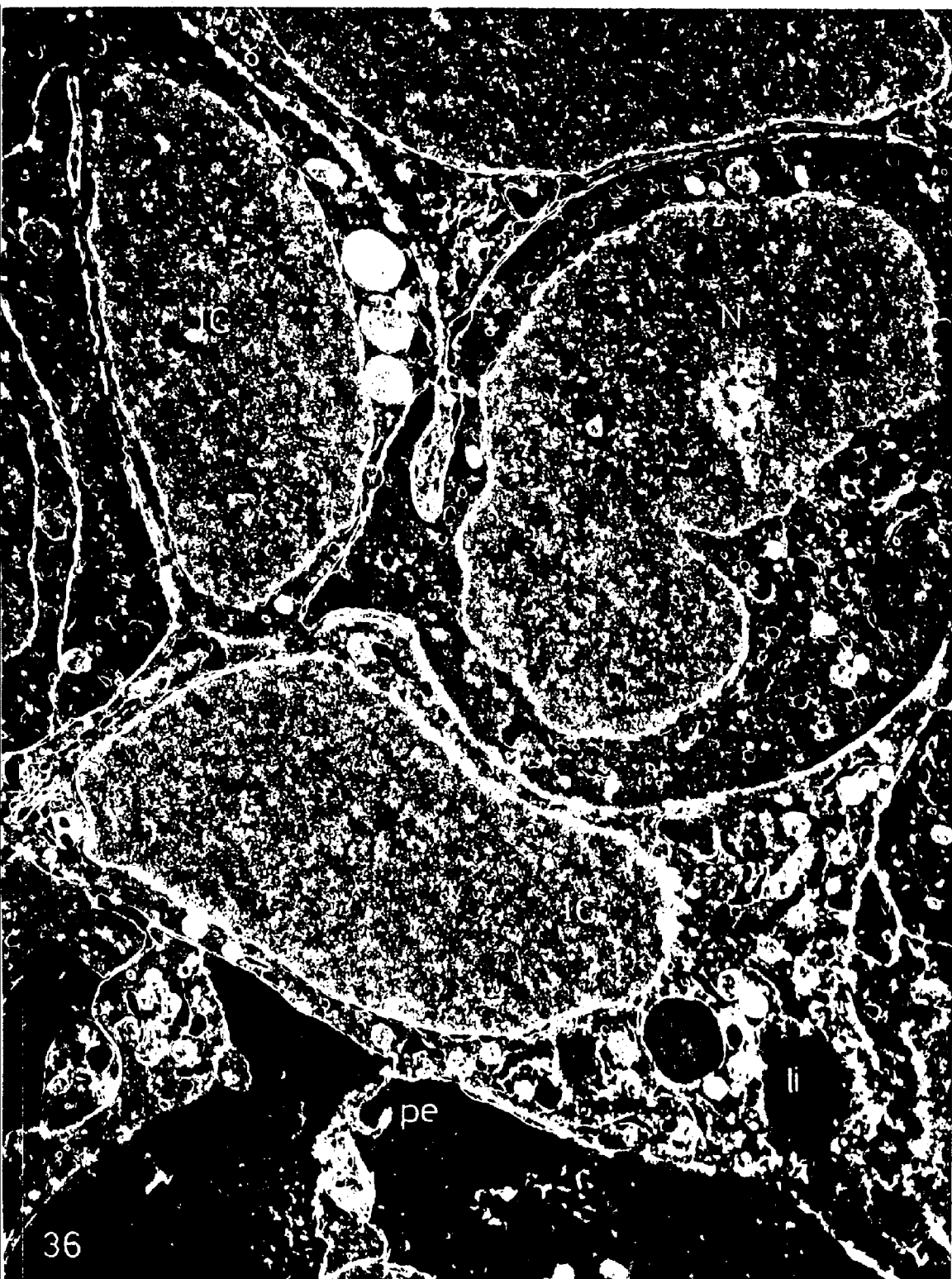


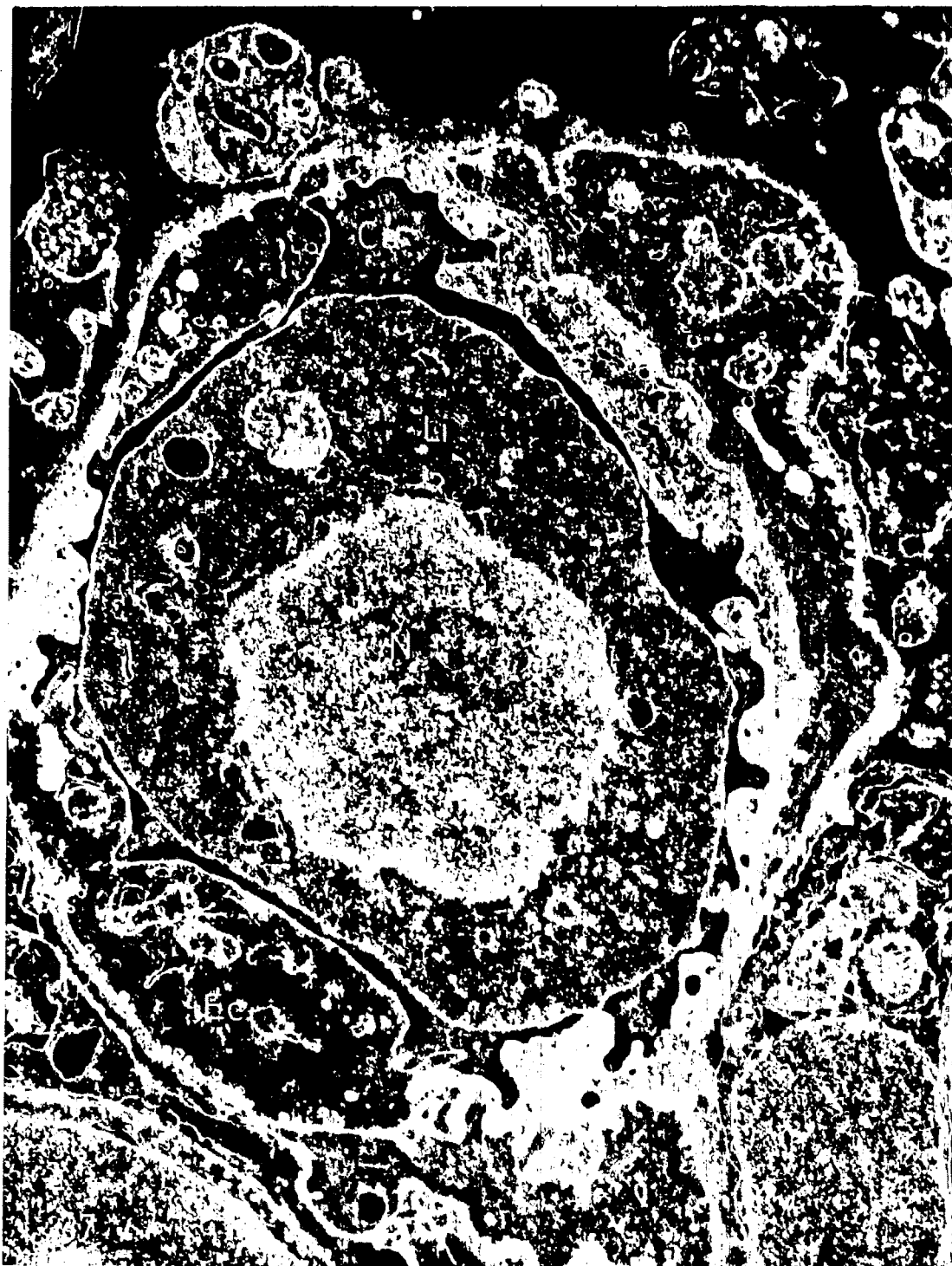


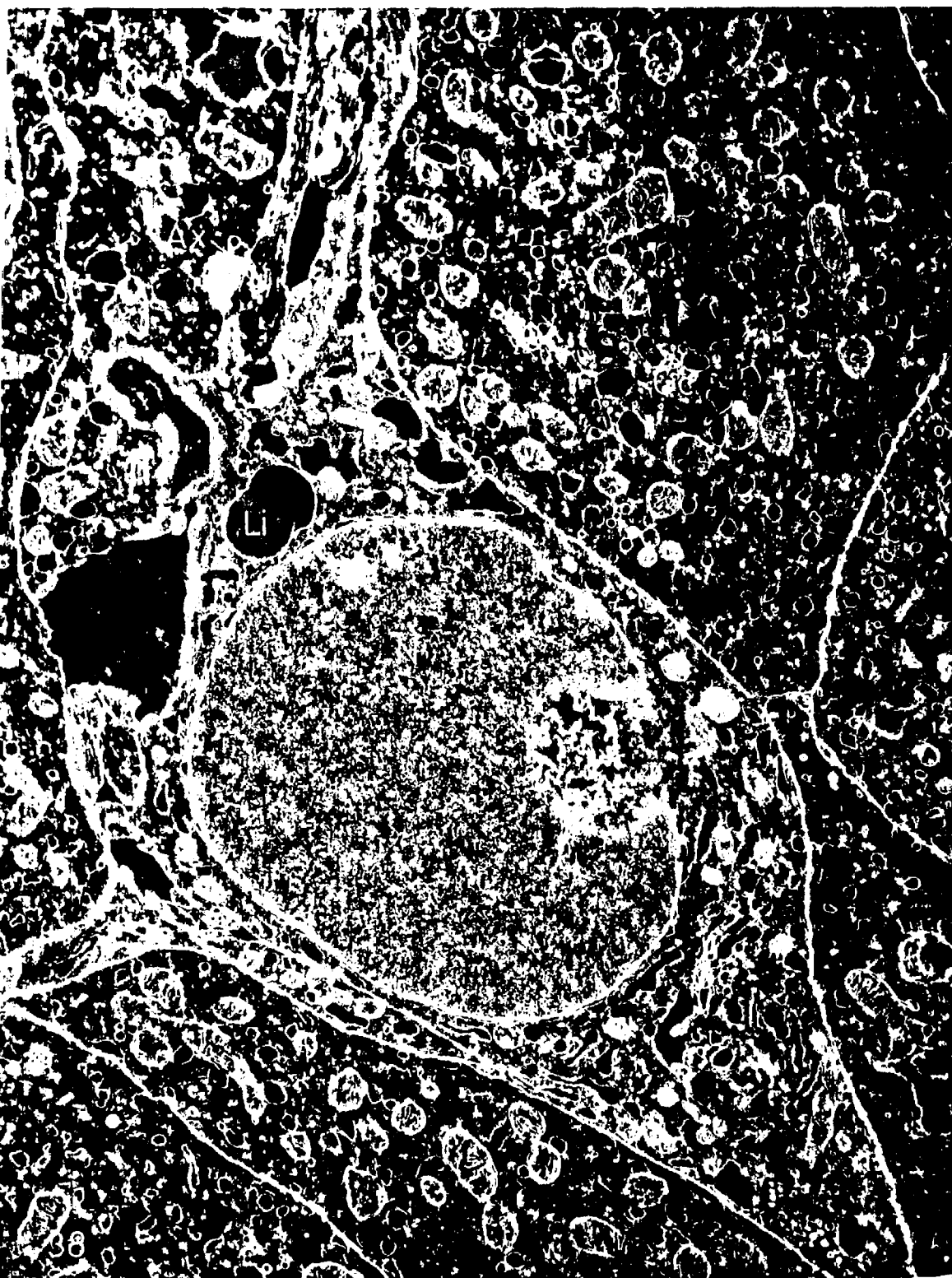


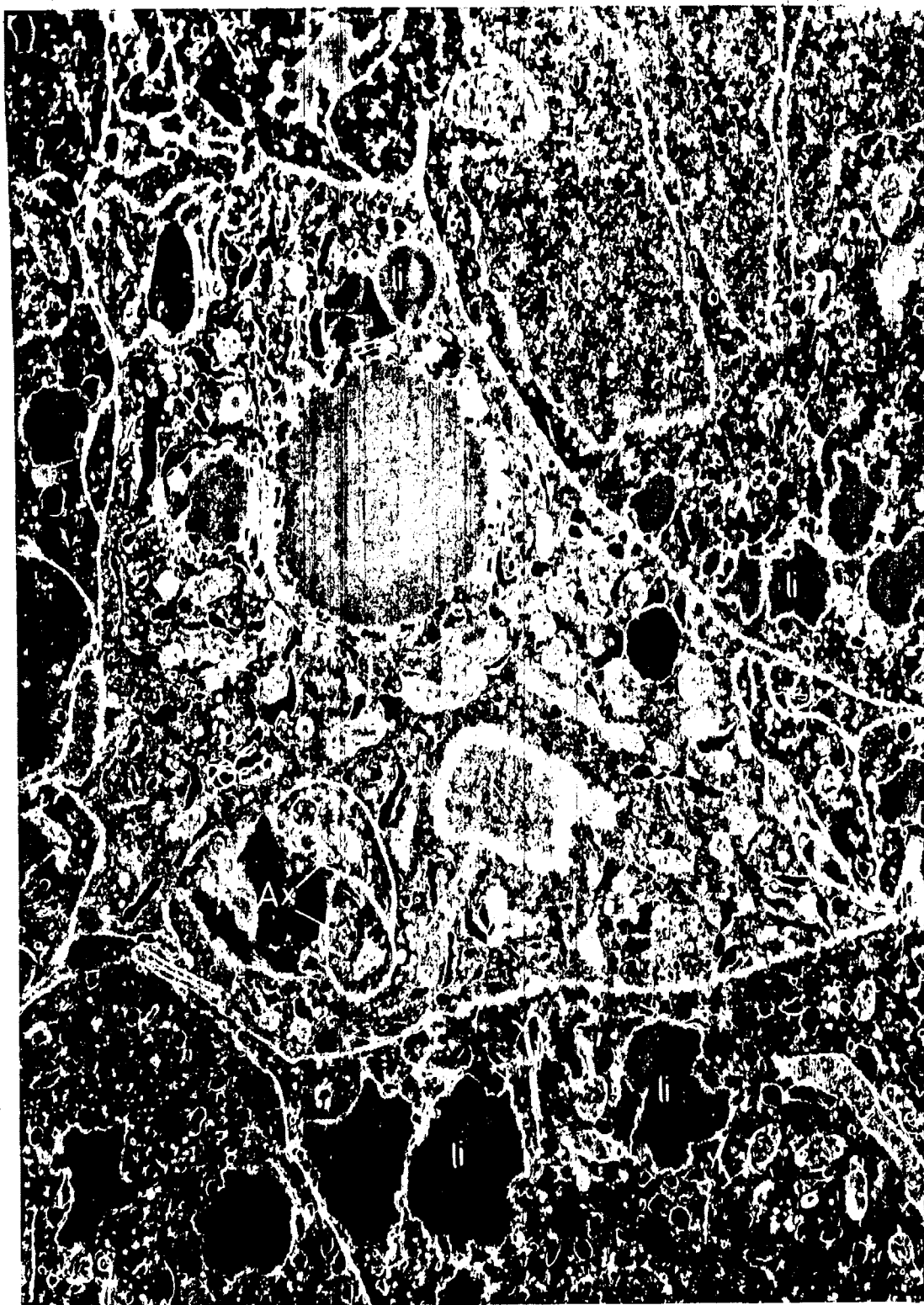


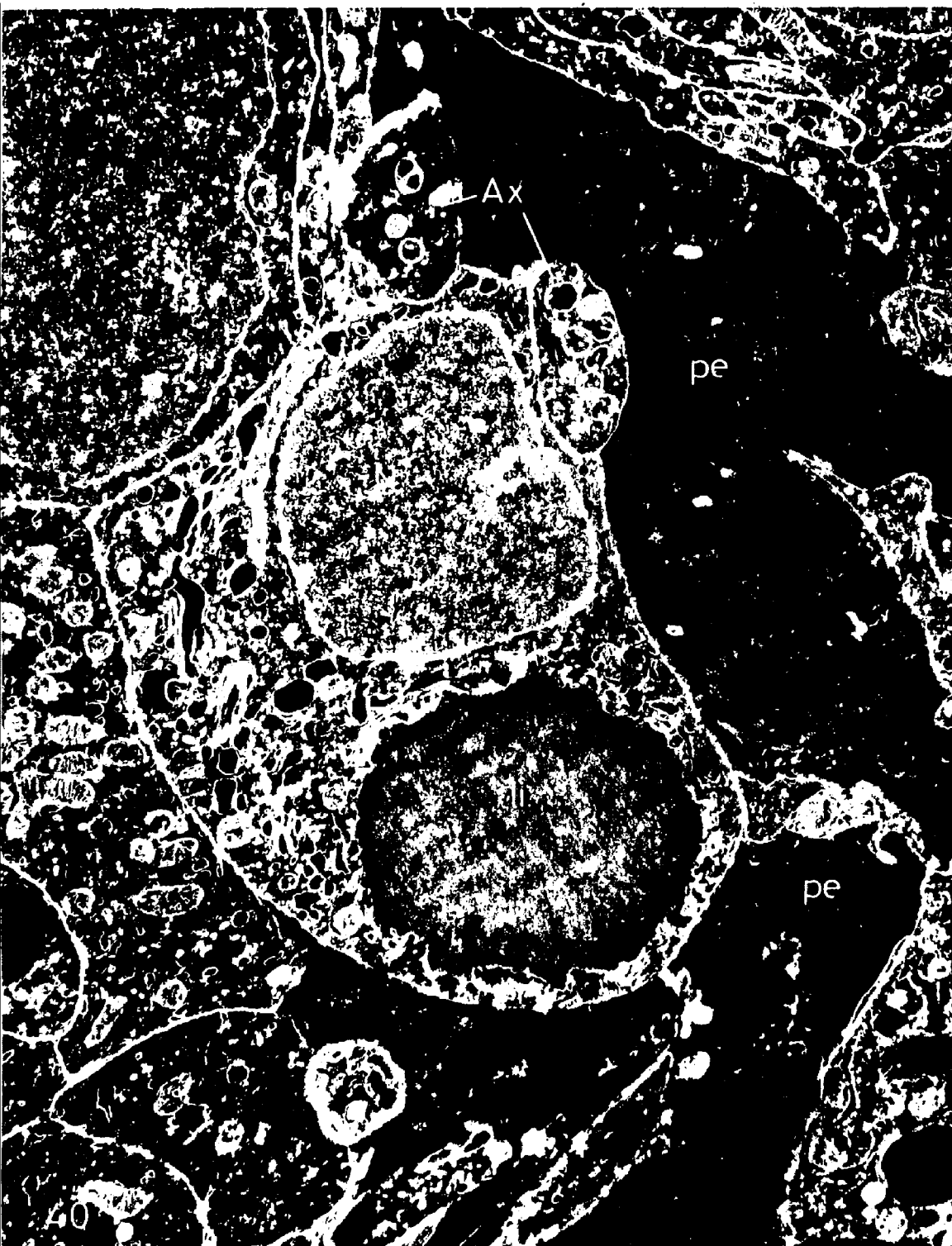






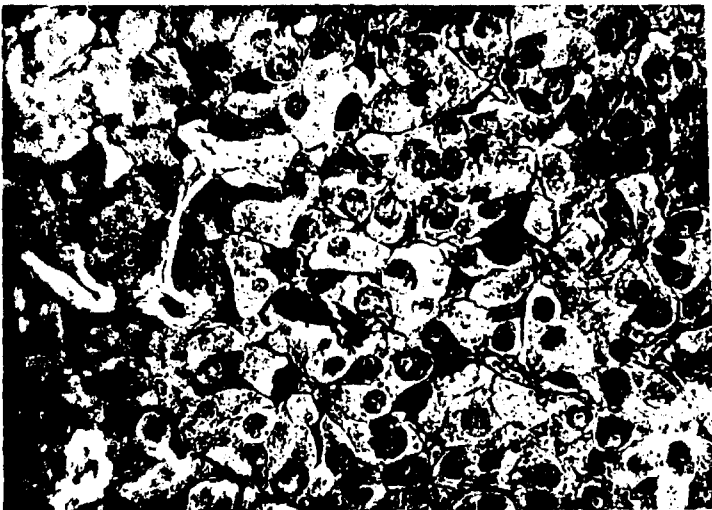






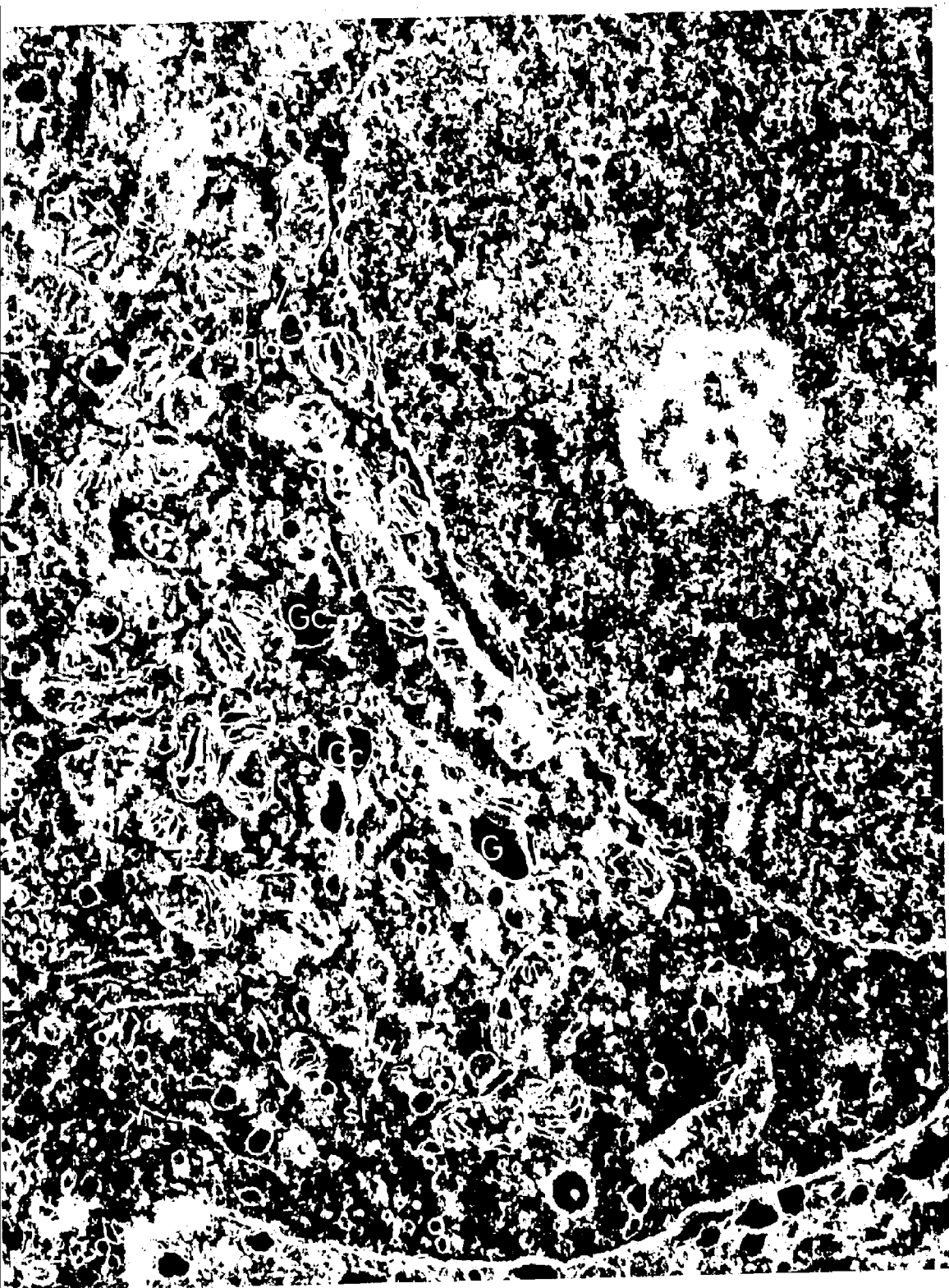


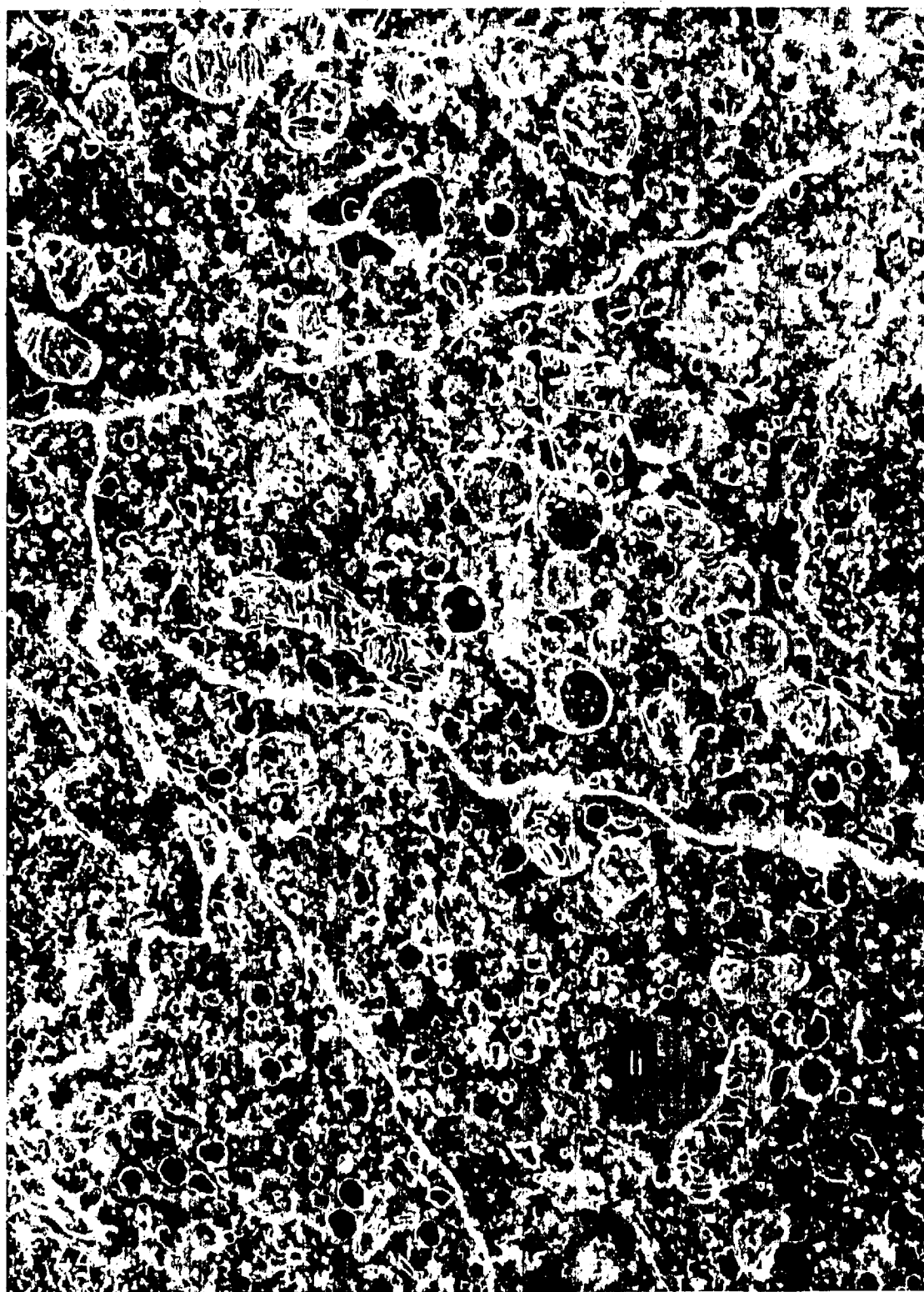
GRUPO Nº 4
RATAS EXPERIMENTALES
ULTRASONICO CRONICO.
Fig. 42 a fig. 47.

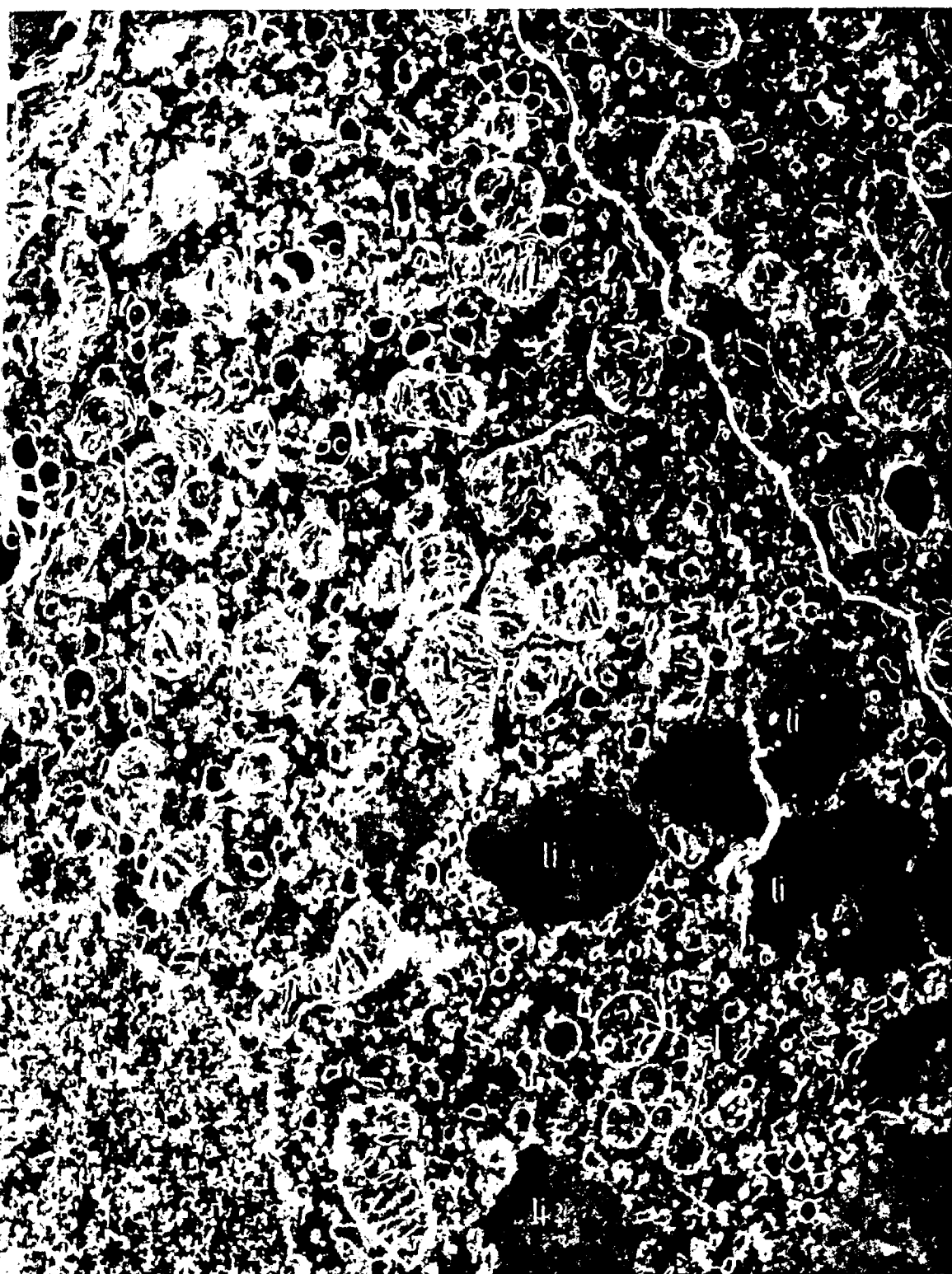


MUESTREO PARA MICROSCOPIA OPTICA DEL BLOQUE DE E.E.,
TEÑIDO CON AZUL DE TOLUIDINA.

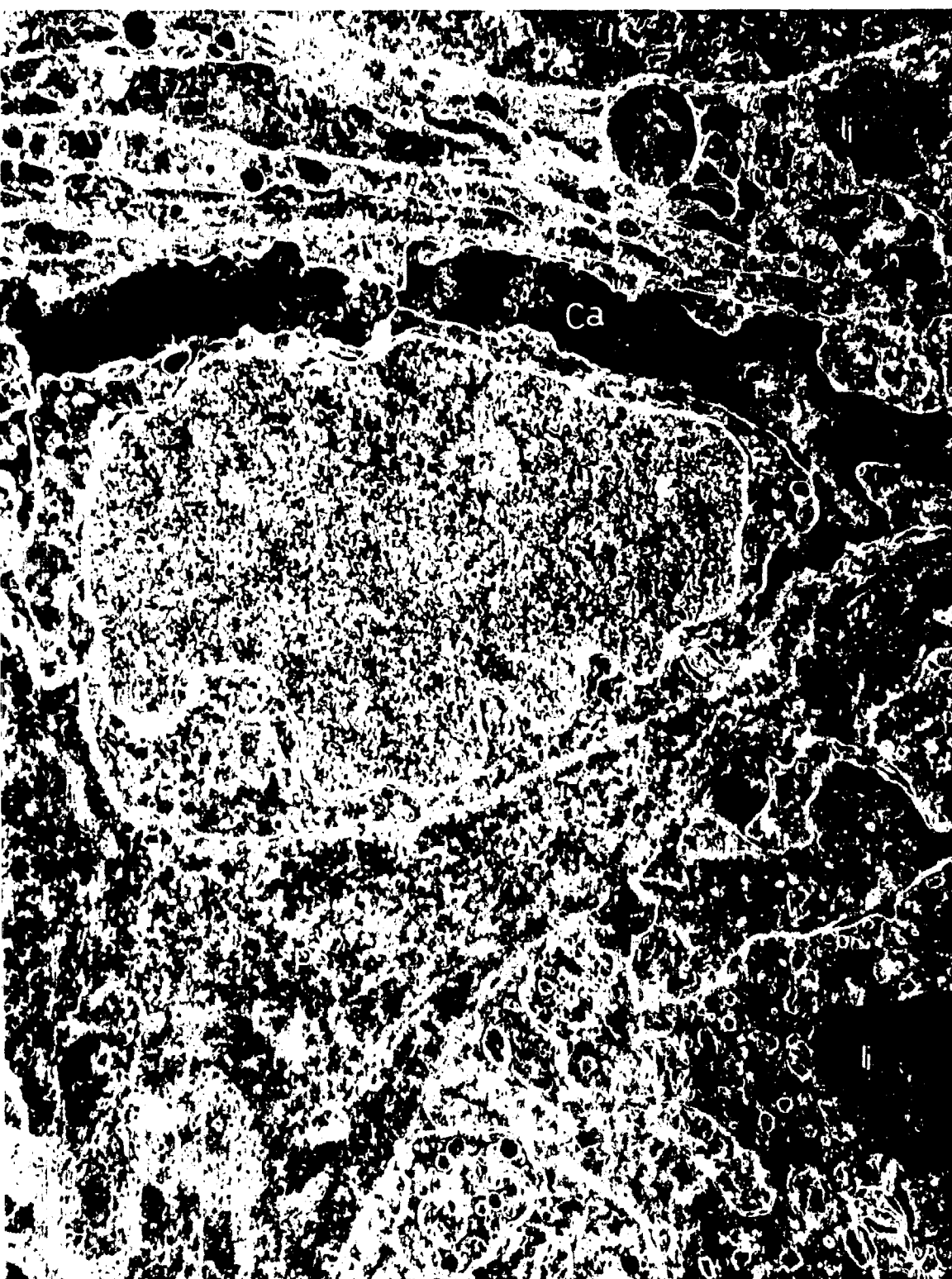








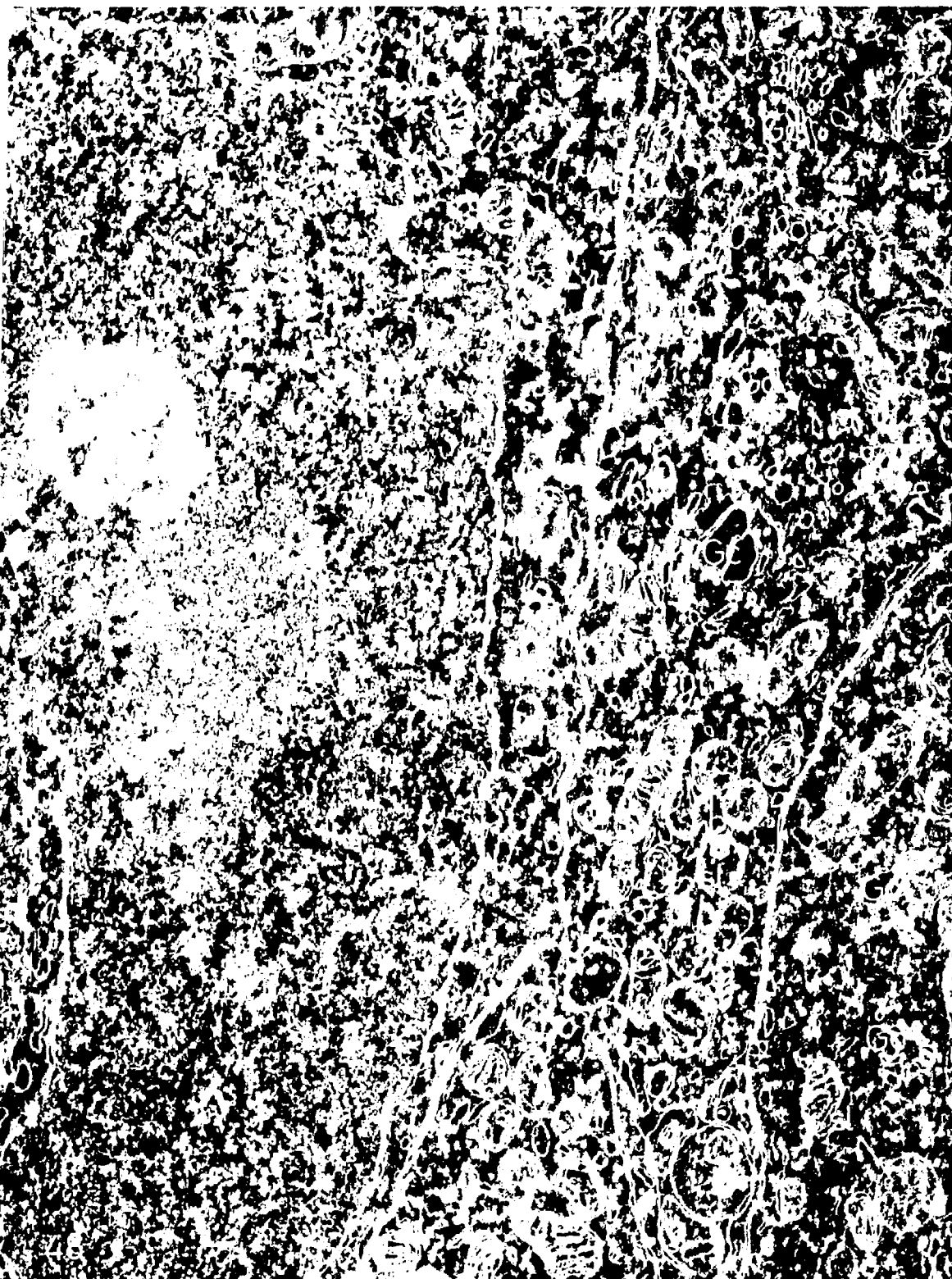


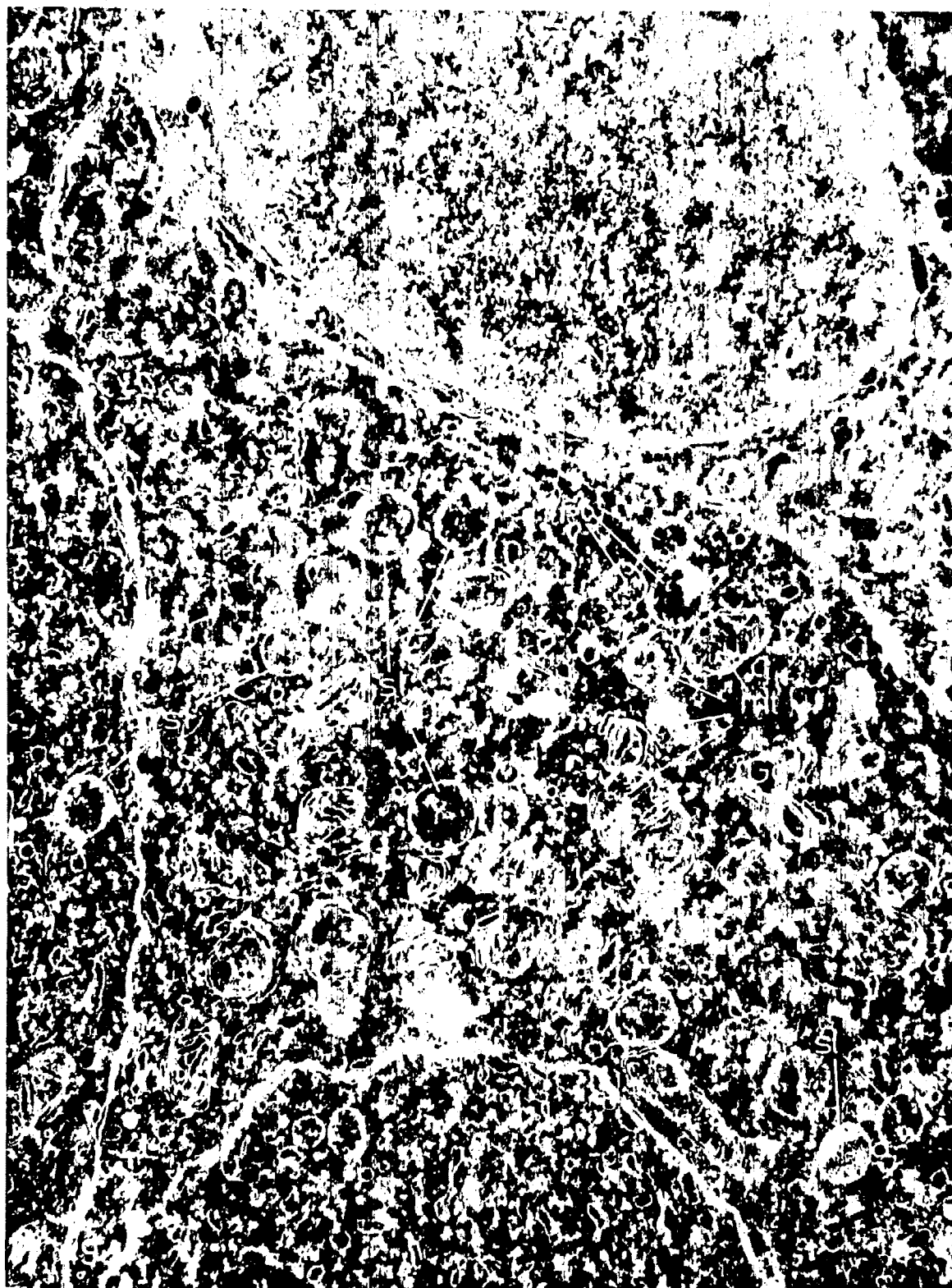


GRUPO Nº 5
RATAS EXPERIMENTALES
ULTRASONICO GANGLIECTOMIZADO CRONICO.
Fig. 48 a fig. 52.

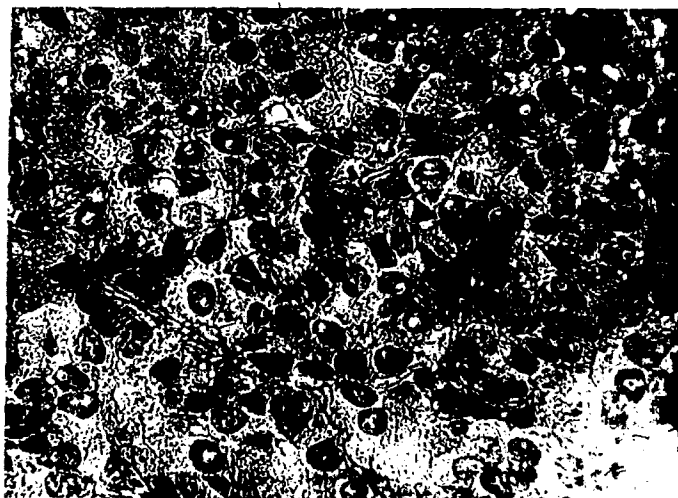


MUESTREO PARA MICROSCOPIA OPTICA DEL BLOQUE DE M.E.,
TEÑIDO CON AZUL DE TOLUIDINA.



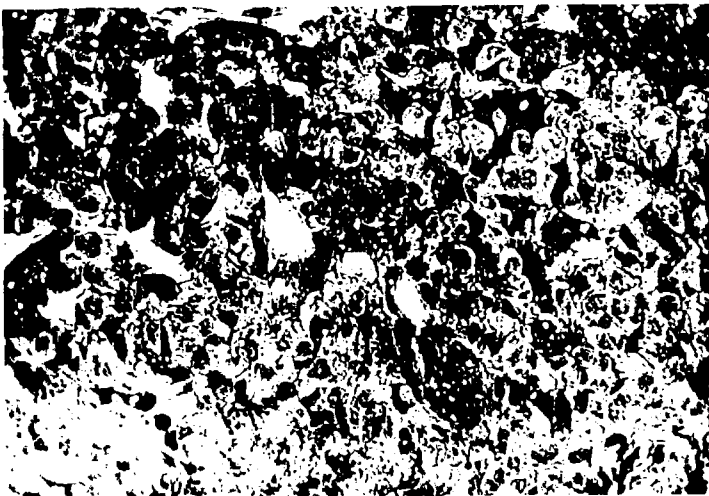


GRUPO Nº 6
 RATAS EXPERIMENTALES.
 FRIO AGUDO.GANG.
 Fig. 53 a fig. 68.



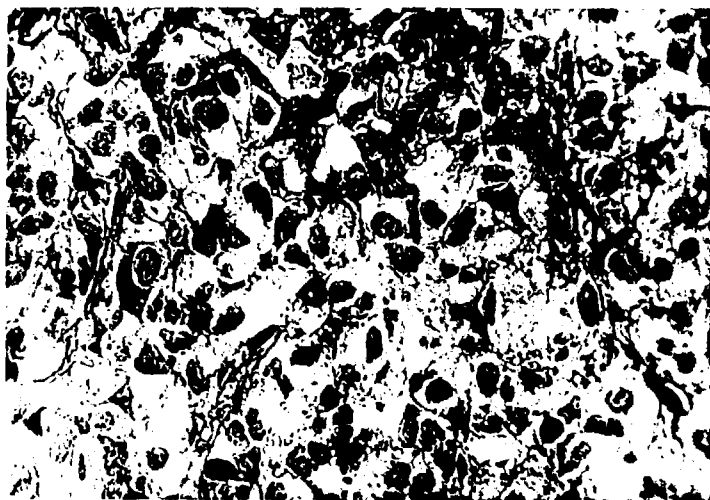
MUESTREO PARA MICROSCOPIA OPTICA DEL BLOQUE DE M.E.,
 TEÑIDO CON AZUL DE TOLUIDINA.

GRUPO Nº 7
RATAS EXPERIMENTALES.
FRIO CRONICO.
Fig. 69 a fig. 73.



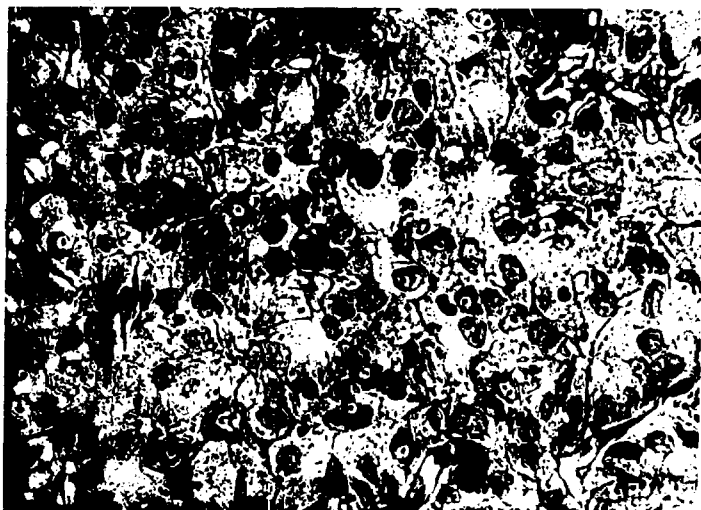
MUESTRO PARA MICROSCOPIA OPTICA DEL BLOQUE DE M.E.,
TEÑIDO CON AZUL DE TOIUIDINA.

GRUPO Nº 8
RATAS EXPERIMENTALES.
FRIO GANGLIECTOMIZADO CRONICO.
Fig. 74 a fig. 78.



MUESTRO PARA MICROSCOPIA OPTICA DEL BLOQUE DE M.E.,
TEÑIDO CON AZUL DE TOLUIDINA.

GRUPO Nº 9
RATAS EXPERIMENTALES.
MARCHA FORZADA AGUDO GANG.
Fig. 79 a Fig. 89.



MUESTREO PARA MICROSCOPIA OPTICA DEL BLOQUE DE M. E.
TEÑIDO CON AZUL DE TOLUIDINA.

GRUPO Nº 10
 RATAS EXPERIMENTALES.
 MARCHA FORZADA GANGLIECTOMIZADO CRONICO=
 Fig. 90 a fig. 96.



MUESTREO PARA MICROSCOPIA OPTICA DEL BLOQUE DE M. E.
 TEÑIDO CON AZUL DE TOLUIDINA.

FIGURAS.AUMENTOS (APROX)

1ª y 2ª	7.000
3ª, 4ª y 5ª	20.000
6ª	7.000
7ª	20.000
8ª	30.000
9ª, 10ª, 11ª, 12ª y 13ª	20.000
14ª y 15ª	7.000
16ª y 17ª	20.000
18ª	10.000
19ª, 20ª, 21ª, 22ª, 23ª y 24ª	20.000
25ª	7.000
26ª, 27ª, 28ª, 29ª, 30ª, 31ª, 32ª, 33ª, 34ª, 35ª, 36ª y 37ª	20.000
38ª, 39ª, 40ª y 41ª	15.000
42ª, 43ª, 44ª, 45ª, 46ª, 47ª, 48ª, 49ª, 50ª, 51ª y 52ª	20.000
53ª	7.000
54ª, 55ª, 56ª y 57ª	20.000
58ª, 59ª y 60ª	25.000
61ª y 62ª	15.000
63ª, 64ª, 65ª y 66ª	20.000
67ª	25.000
68ª, 69ª, 70ª, 71ª, 72ª y 73ª	20.000
74ª, 75ª, 76ª, 77ª y 78ª	20.000
79ª y 80ª	7.000
81ª, 82ª, 83ª, 84ª, 85ª, 86ª, 87ª, 88ª, 89ª y 90ª	20.000
91ª	25.000
92ª, 93ª, 94ª, 95ª y 96ª	20.000

INTERPRETACION DE LAS ABREVIATURAS.

Ax	Axón.
Ca	Capilar.
ca	Canículo.
cd	Cuerpo denso.
Ec	Célula entotelial.
Gc	Complejo de Golgi.
Ic	Célula insterticial.
Li	Linfocito.
li	Lípido.
lp	Lípido.
ls	Seudolisosoma.
mt	Mitocondria.
N	Núcleo.
nu	Nucleolo.
P	Pineocito.
pe	Espacio pericapilar.
po	Poros.
Pt	Polo terminal.
r.e.l.....	Retículo endoplásmico liso.
r.e.r.....	Retículo endoplásmico rugoso.
rC	Raicilla ciliar.
sf	Seudofolículo.
Sch	Células de Schwann.
sl	Seudolisosoma.
Ue	Unión estrecha.

